

Treball de Final de Grau
Grau en Enginyeria Química

**Preparació i propietats de complexos
d'àcid poli(γ -glutàmic) biosintètic i
tensioactius catiónics**

Memòria

Autor: Sergi Palma Martín
Directora: Montserrat García Álvarez
Codirectora: Lourdes Urpí Garriga
Convocatòria: Juny 2018



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Industrial de Barcelona



RESUM

El PGGA és un polímer produït a escala industrial per biotecnologia, d'entre les seves propietats cal destacar que és biodegradable i biocompatible. Gràcies a la seva innocuïtat, nombrosos estudis situen el PGGA com un polímer molt atractiu pel sector químic, alimentari, com a embalatge o formant part de sistemes alliberadors de fàrmacs. Tot i això, el seu ús es veu limitat per diversos factors: és inestable en medis humits i difícilment sintetitzable a gran escala.

Durant aquest projecte s'han sintetitzat dos complexos iònics estables de l'àcid poli(γ -glutàmic) microbià amb dos tensioactius catiónics, un bromur d'alquiltrimetilamoni i un bromur d'alquiltrimetilfosfoni, en ambdós casos amb una cadena alquílica lineal de 18 carbonis, bromur d'octadeciltrimetilamoni i bromur d'octadeciltrimetilfosfoni, 18ATMA·Br i 18ATMP·Br respectivament.

Els complexos, àcid poli(γ -glutàmic)-octadeciltrimetilamoni i àcid poli(γ -glutàmic)-octadeciltrimetilfosfoni, 18ATMA·PGGA i 18ATMP·PGGA respectivament, s'han sintetitzat en dissolució aquosa per la interacció de la sal sòdica del poliàcid, Na·PGGA, amb els tensioactius catiónics.

S'han estudiat les propietats d'aquests polímers, tant a nivell químic com tèrmic, mitjançant les tècniques habituals de H-RMN, TGA, DSC i IR.

La tècnica espectroscòpia d'infraroig (IR) i de ressonància magnètica nuclear d'hidrogen (H-RMN) ha constatat que els complexos presenten la constitució química esperada. En concret, per H-RMN s'ha evidenciat que s'obtenen amb una composició PGGA:tensioactiu propera a l'1:1, per tant quasi estequiomètrica. En relació a la solubilitat aquests complexos són insolubles en aigua, però sí són solubles en dissolvents orgànics com el cloroform.

Mitjançant la calorimetria diferencial d'escombrat (DSC) s'han determinat les temperatures de fusió i cristal·lització d'ambdós complexos. Estudiant el comportament dels complexos durant diversos processos de cristal·lització isoterma, utilitzant la teoria d'Avrami, s'ha deduït la geometria de creixement dels cristalls que es formen.

A partir de l'anàlisi termogravimètrica (TGA) s'ha realitzat un estudi de la descomposició

tèrmica dels complexos i s'han relacionat els resultats obtinguts amb el mecanisme de degradació de cadascun dels complexos.

Un altre dels objectius del treball ha estat obtenir pel·lícules dels complexos per estudiar-ne el comportament en medis aquosos. L'estudi s'ha fet mitjançant espectroscòpia UV prèvia determinació de la longitud d'ona de màxima absorció.

Per últim s'han fet assajos per tal d'analitzar les propietats biocides dels tensioactius, el PGGA i els complexos en presència dels bacteris *Escherichia Coli* i *Staphylococcus Aureus*. Els complexos han mostrat certa activitat antimicrobiana que podria relacionar-se amb la dissociació dels complexos que es produeixen en aigua. Aquest comportament indica que aquests polímers tenen un potencial interès en aplicacions per embalatge com a recobriments.

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	10
1.1. Els tensioactius	10
1.1.1. Tensioactius 18ATMA·Br i 18ATMP·Br	11
1.2. L'àcid poli-(γ -glutàmic) (PGGA)	12
2. OBJECTIUS	16
2.1. Objectiu general	16
3. EXPERIMENTAL	18
3.1. Compostos	18
3.1.1. Na·PGGA	18
3.1.2. 18ATMA·Br	18
3.1.3. 18ATMP·Br	18
3.2. Síntesi dels complexos	19
3.2.1. 18ATMP·PGGA	19
3.2.2. 18ATMA·PGGA	21
3.3. Mètodes de caracterització	22
3.3.1. Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear	22
3.3.2. Espectroscòpia d'infraroig	22
3.3.3. Termogravimetria	22
3.3.4. Calorimetria diferencial d'escombrat	22
3.3.5. Cristal·lització isotèrmica	23
3.3.6. Espectroscòpia Ultraviolada	25

3.3.7.	Determinació de la dissociació de complexos en medis aquós a diferents pH	26
3.3.8.	Anàlisi de l'activitat antimicrobiana del 18ATMP-PGGA i del 18ATMA-PGGA	27
4.	RESULTATS	31
4.1.	Síntesi i preparació dels complexos	31
4.2.	Caracterització química dels complexos.....	32
4.2.1.	Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear	32
4.2.2.	Espectroscòpia d'infraroig	35
4.3.	Propietats tèrmiques dels complexos	38
4.3.1.	Termogravimetria.....	38
4.3.1.	Calorimetria diferencial d'escombrat.....	40
4.4.	Estudi de la dissociació dels complexos en medi aquós	47
4.4.1.	Determinació de la longitud d'ona de màxima absorció	48
4.4.2.	Determinació de l'absorbància.....	48
4.4.3.	Influència del pH	49
4.4.4.	Influència del tensioactiu.....	50
4.5.	Anàlisi de l'activitat antimicrobiana dels complexos	51
5.	AVALUACIÓ ECONÒMICA	55
5.1.	Cost dels productes	55
5.2.	Cost de caracterització.....	56
5.3.	Cost personal	56
5.4.	Cost de material de laboratori.....	57
5.5.	Resum de costos	58
6.	AVALUACIÓ DE L'IMPACTE AMBIENTAL	60

7. CONCLUSIONS	63
8. AGRAÏMENTS	65
9. BIBLIOGRAFIA	67

GLOSSARI

- **18ATMA·Br**: Bromur d'octadeciltrimetilamoni
- **18ATMP·Br**: Bromur d'octadeciltrimetilfosfoni
- **18ATMA·PGGA**: Àcid poli (γ -glutàmic)-octadeciltrimetilamoni
- **18ATMP·PGGA**: Àcid poli (γ -glutàmic)-octadeciltrimetilfosfoni
- **ABS**: Absorbància
- **APT**: Aigua peptonada tamponada
- **ATMA**: Alquiltrimetilamoni
- **ATMP**: Alquiltrimetilfosfoni
- **CDCL₃**: Cloroform deuterat
- **DSC**: *Differential Scanning Calorimetry* (Calorimetria diferencial d'escombrat)
- **H-RMN**: *Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear d'hidrogen)
- **IR**: *Infrared spectrography* (Espectroscòpia d'infraroig)
- **Metanol-D₄**: Metanol deuterat
- **PGGA**: Àcid poli (γ -glutàmic)
- **TGA**: *Thermogravimetric Analysis* (Anàlisi termogravimètrica)
- **TSA**: *Trypticase Soy Agar*
- **TSB**: *Tryptic Soy Broth*
- **TMS**: Tetrametilsilà
- **UV**: *Ultraviolet-visible spectroscopy* (Espectroscòpia UltraViolada)

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Els tensioactius

Els tensioactius són molècules amfifíliques, és a dir, gràcies a la seva estructura poden mantenir afinitat amb dissolvents polars, com l'aigua (part hidròfila) i simultàniament afinitat amb dissolvents de menor polaritat, orgànics, com per exemple el cloroform (part lipòfila). També reben el nom de *surfactant* o agents de superfície.

Cal destacar que són substàncies que poden actuar com detergents, humectants, emulsionants o solubilitzants entre d'altres utilitats. La majoria de tensioactius són d'origen sintètic, tot i que els naturals són cada cop més utilitzats.

Quan entren en contacte amb dissolvents, els tensioactius tenen la capacitat d'autogregar-se espontàniament formant geometries diverses, amb graus de curvatura i dimensions característiques diferents. Això és degut a l'aparició de forces intermoleculars dèbils: ponts d'hidrogen o forces de van der Waals; fet que permet que es pugui controlar la forma o la mida variant la concentració, la temperatura o el pH del medi. [1]

El seu comportament amfifílic provoca que es situïn a les interfícies orientant els seus grups polars cap al dissolvent polar i els grups apolars cap a la fase apolar. És per això que els tensioactius acostumen a disminuir la tensió superficial entre interfases.

Els diferents tipus de tensioactiu es poden classificar segons les característiques del seu extrem hidròfil. Principalment es divideixen en quatre grups:

- Tensioactius aniònics: són aquells que tenen la part hidròfila carregada negativament. Són principalment detergents o humectants.
- Tensioactius catiònics: tenen la part hidròfila carregada positivament. En aquest grup s'inclouen els antisèptics o els condicionadors.
- Tensioactius amfòters: la seva part hidròfila té una càrrega negativa i una altra de positiva. La naturalesa de la càrrega varia en funció del pH del medi, essent tensioactius catiònics en medi àcid i aniònics en medi bàsic.

- Tensioactius no iònics: aquests no són ionitzables. Estan formats per una cadena alquílica llarga i un grup sense càrrega. Però ha de ser suficientment polar per tal de que sigui soluble en aigua.

1.1.1. Tensioactius 18ATMA·Br i 18ATMP·Br

Els tensioactius que s'han fet servir per tal de sintetitzar els dos complexos estudiats durant el projecte són el 18ATMA·Br i el 18ATMP·Br, són compostos molt interessants degut a les seves propietats biològiques i físiques.

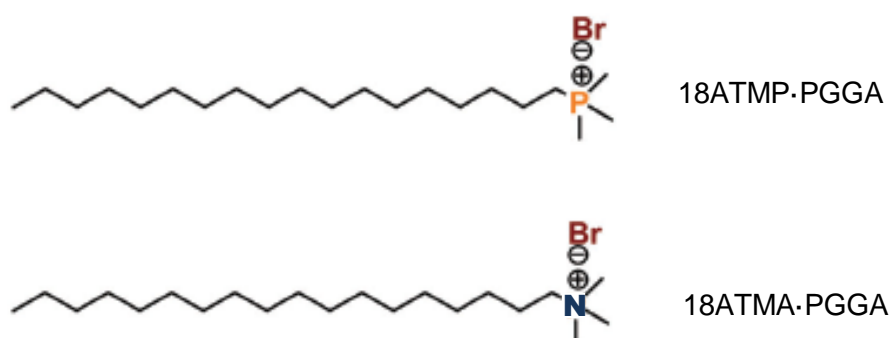


Figura 1: Bromur d'octadeciltrimetilfosfoni (part superior) i bromur d'octadeciltrimetilamoni (part inferior)

Com es pot observar a la *Figura 1*, ambdós són tensioactius catiónics, la seva part hidròfila està carregada positivament.

Es tracta de sals organofosfonades o organonitrogenades, formades per una llarga cadena alquílica, que tenen l'habilitat de formar mesofases termotròpiques, és a dir, esdevenen en rangs de temperatura determinats. [2]

Durant el transcurs d'aquest treball se'n descriuran les seves característiques tèrmiques i químiques.

1.2. L'àcid poli-(γ -glutàmic) (PGGA)

L'àcid poli-(γ -glutàmic) és un polímer d'origen natural sintetitzat a partir de diverses espècies de bacteries *Bacillus*. És tracta d'una homopoliamida composta per monòmers de l'àcid glutàmic units entre ells per un enllaç peptídic entre el grup amino i el grup γ -carboxil.

Segons la nomenclatura IUPAC el γ -PGA s'anomena poli[imino-1-(2-carboxietil)-2-oxo-1,2-entandil]. A continuació es presenta l'estructura química de la unitat repetitiva del polímer.

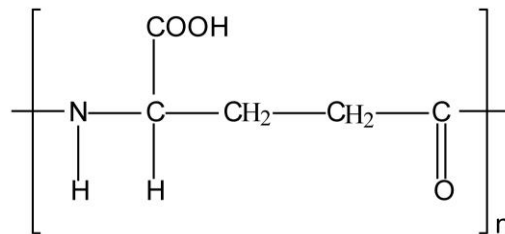


Figura 2: unitat repetitiva de l'àcid-(γ -glutàmic)

Com es pot observar a la seva estructura hi ha un centre asimètric, aquest fet li atribueix al PGGA un gran ventall de possibilitats dins el camp dels Nylons i les poliamides tradicionals. [3]

El polímer γ -PGA té un isòmer, l'àcid poli(α -glutàmic). La diferència principal es troba en la posició de l'enllaç peptídic, que en aquest cas s'estableix entre el grup amino i el grup α -carboxil. A diferència del PGGA, aquest compost s'ha de sintetitzar de forma química o microbiològica.

Va ser descobert per primer cop l'any 1937 per Bruckner, quan una càpsula del bacteri *Bacillus anthracis* va ser alliberada en el medi al esterilitza-la amb un autoclau, el 1942 es va trobar també com a producte de la fermentació del bacteri *Bacillus subtilis*. [4]

Més endavant es va descobrir la presència del PGGA en la composició d'un aliment tradicional nipó, el *Natto*, plat basat en la fermentació de llavors de soja. Esta compostat per una barreja de PGGA i un polisacàrid. [5]

Tot i que es coneix que l'àcid poli-(γ -glutàmic) és produït per bacteris Gram positiu, en els

quals s'inclouen els *Bacillus*, també hi ha almenys un bacteri Gram-negatiu (*Fusobacterium nucleatum*) que té la capacitat de produir-lo.

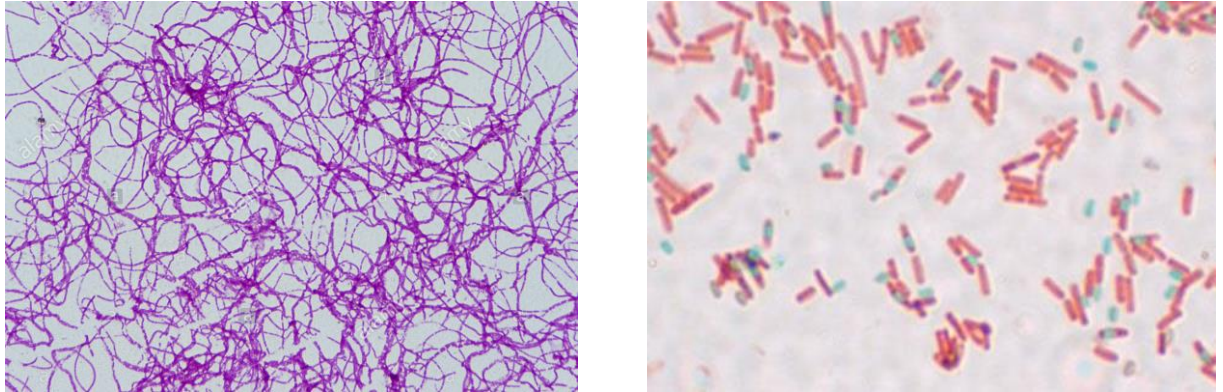


Figura 3: bacteri *Bacillus Anthracis* (esquerra) i bacteri *Bacillus Subtilis* (dreta)

El PGGA és biodegradable i no és tòxic, fet que el fa, tant a ell com als seus derivats, un polímer interessant per una ampla gama d'aplicacions industrials. En la seva forma aniònica és soluble en aigua.

Les dificultats que comporta la seva modificació química, ha determinat que el seu desenvolupament tecnològic sigui encara incipient, però gracies a les seves propietats l'interès en sintetitzar-lo químicament ha anat en augment.

Inicialment es pretenia obtenir-lo mitjançant un procés de policondensació de l'àcid glutàmic amb el carboxil- α protegit i activant el carboxil- γ , però la seva tendència a formar compostos cíclics va desembocar en la necessitat d'utilitzar un monòmer dipèptid modificat, l' γ -glutamil-glutàmic. Un cop reacciona s'obté un polièster que quan s'hidrolitza dona lloc al PGGA. [6]

Tot i que és un mètode efectiu, els polímers obtinguts són de pes molecular baix, inferior a 20000 g/mol.

Més endavant es va començar a utilitzar un mètode de síntesi basat en la polimerització per obertura de cicles, concretament en la polimerització dels N-carboxilanhídrids dels α -aminoàcids.

Però el problema principal rau en la inestabilitat del γ -N-carboxianhídrid. Aquest compost és difícil de manipular i els pesos moleculars es limiten degut a l'aparició de productes en

descomposició. [7]

Les principals aplicacions del PGGA es troben en el camp de l'alimentació, però el seu ús s'ha estès a altres camps degut a les seves propietats, com per exemple en sistemes alliberadors de fàrmacs, per controlar l'alliberació de paclitaxel, com a additiu alimentari o com a floculant i gelificant. [8]

2. OBJECTIUS

2.1. Objectiu general

- Obtenció de complexos iònics de PGGA i tensioactius catiónics i estudi de les seves propietats

A continuació es defineixen els objectius específics d'aquest projecte.

- Preparació dels complexos 18ATMA-PGGA i 18ATMP-PGGA
- Determinació de la seva estequiometria mitjançant l'espectroscòpia de ressonància magnètica d'hidrogen
- Caracterització dels dos complexos mitjançant tècniques calorimètriques, DSC i TGA i per espectroscòpia IR
- Estudi de la cinètica de cristallització dels complexos sintetitzats mitjançant DSC i aplicant la teoria d'Avrami
- Preparació de films a partir dels complexos i estudi de la seva dissociació en medi aquós en funció del pH.
- Anàlisi de l'activitat antimicrobiana enfront a dos tipus de bacteris: *Escherichia Coli* i *Staphylococcus Aureus*

3. EXPERIMENTAL

3.1. Compostos

3.1.1. Na-PGGA

L'àcid poli-(γ -glutàmic) utilitzat en la preparació dels diferents complexos d'aquest projecte, ha estat subministrat per l'empresa Dr Kubota of Meji Co (Japó).

L'àcid s'ha aconseguit mitjançant una biosíntesi amb un pes molecular mitjà aproximat de 300.000 Da i una relació D:L enantiomèrica de 59:41.

3.1.2. 18ATMA·Br

El bromur d'octadeciltrimetilamoní (18ATMA·Br) usat durant el projecte, és un tensioactiu catiónic comercial, de la marca Fluka, i puresa $\geq 97\%$.

3.1.3. 18ATMP·Br

El bromur d'octadeciltrimetilfosfoni utilitzat durant el projecte, ha estat sintetitzat al grup de recerca POL del departament d'Enginyeria Química on he realitzat aquest treball. A continuació es detalla el protocol.

S'afegeixen lentament 5 ml d'una solució 1M de trimetilfosfina (TMP) dissolta en 5 mmols de toluè a 5,5 mmol de 1-bromooctadecà comercial (Sigma-Aldrich i puresa del 96%), escalfat prèviament a 80°C en una atmosfera inerta de nitrogen.

La mescla s'escalfa a 116°C en un bany d'oli de silicona, on es manté durant 24h en agitació constant. Seguidament es recupera el precipitat mitjançant filtració. Aquest sòlid, s'ha de netejar amb toluè diversos cops i finalment es seca en un dessecador al buit durant 48h.

La sal obtinguda en forma de pols blanca, és soluble en cloroform, metanol i altres dissolvents orgànics, i en aigua a temperatures superiors a 30°C.

3.2. Síntesi dels complexos

3.2.1. 18ATMP-PGGA

Sintetitzat segons la reacció següent:

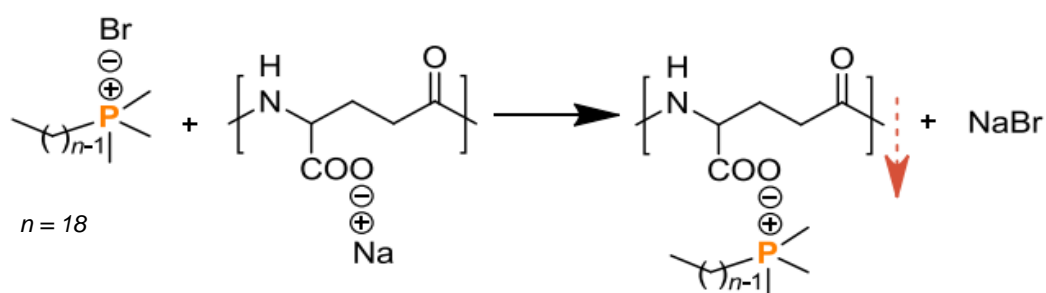


Figura 4: mecanisme de reacció del 18ATMP-PGGA

	18ATMP·Br + Na·PGGA → 18ATMP·PGGA + NaBr			
<i>PM (mg/mmol)</i>	409,45	151	457,55	102,9
<i>Estequiometria</i>	1	1	1	1
<i>Quantitat (mmol)</i>	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Massa (mg)</i>	1024	382,5	1143,88	257,25

Taula 1: relació estequiomètrica i de massa entre reactius i productes de la reacció de síntesi del 18ATMP-PGGA

En una balança de precisió es pesen les quantitats necessàries de cada reactiu per tal d'obtenir dues dissolucions aquoses de 250 ml i 0,01M. En aquest cas aquestes masses són de 1024 mg de bromur d'octadeciltrimetilfosfoni (18ATMP·Br) i 382,5 mg de PGGA.

En un vas de precipitats s'afegeixen 250 ml d'aigua destil·lada i s'escalfa fins a 45°C. Es necessita una temperatura superior a l'ambient, per afavorir la dissolució del solut i la formació de micel·les. Aquesta temperatura es coneguda com temperatura de Krafft. En tensioactius iònics, per sota de la T_{KRAFFT} , la solubilitat es redueix impedit la formació de micel·les i per sobre d'aquesta temperatura, la solubilitat augmenta i les micel·les comencen a formar-se.

En aquest cas la T_{KRAFFT} és 30°C, però si es treballa amb un marge d'uns 15°C per sobre, evita efectes no desitjats. Un cop l'aigua esta a la temperatura desitjada, s'afegeix el 18ATMP·Br i s'agita la dissolució durant 20 minuts.

Paral·lelament, en un vas amb capacitat de 500 ml, s'hi aboquen 250 ml d'aigua destil·lada i s'escalfa a 40°C. Un cop calenta, s'afegeix la massa pesada de PGGA i s'agita durant 20 minuts.

A continuació s'afegeix el 18ATMA·Br, gota a gota, a la dissolució de PGGA i es deixa en una placa tèrmica a 55°C durant 4 hores amb agitació constant.

El precipitat es filtra al buit amb un embut Büchner diversos cops per tal d'eliminar NaBr residual. El sòlid filtrat s'introdueix en un tub de diàlisi i aquest es diposita en un vas amb 1500 ml d'aigua destil·lada durant unes 18 hores a temperatura ambient i agitació. Passades aquestes hores, el tub de diàlisi s'introdueix en un bany d'aigua a 45°C durant dues hores més. Aquest procés extreu les sals de brom presents en el compost d'interès.

Finalment el sòlid es torna a filtrar i es posa en un dessecador sotmès a pressió reduïda. Un cop eliminades les restes d'aigua, es pesa per conèixer el rendiment de la reacció.

3.2.2. 18ATMA-PGGA

Sintetitzat segons la reacció següent:

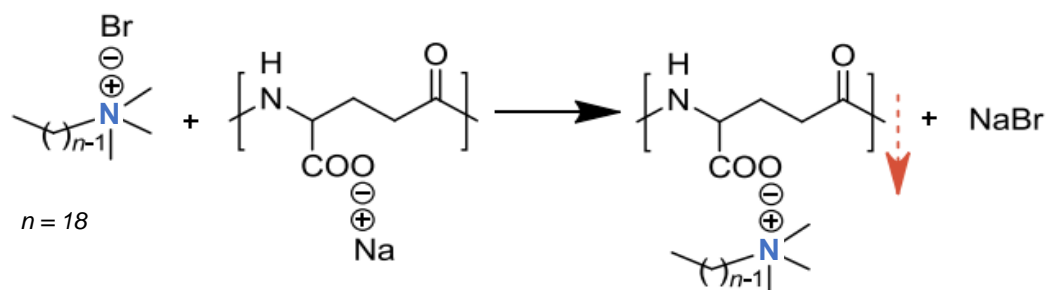


Figura 5: mecanisme de reacció del 18ATMA-PGGA

	18ATMA-Br + Na-PGGA → 18ATMA-PGGA + NaBr			
<i>PM (mg/mmol)</i>	392,52	151	440,62	102,9
<i>Estequiometria</i>	1	1	1	1
<i>Quantitat (mmol)</i>	2,3	2,3	2,3	2,3
<i>Massa (mg)</i>	917,16	357,50	732,9	236,67

Taula 2: relació estequiomètrica i de massa entre reactius i productes de la reacció de síntesi del 18ATMA-PGGA

El procediment experimental emprat per sintetitzar aquest complex és el mateix que en el cas del de fosfoni. L'única diferència a tenir en compte és la temperatura a la que s'ha d'escalfar la dissolució de 18ATMA-Br. La T_{KRAFFT} del tensioactiu és de 35°C, per tant la dissolució s'ha escalfat a uns 50°C.

3.3. Mètodes de caracterització

3.3.1. Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear

L'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear de protó, ^1H -RMN, s'utilitza principalment per determinar l'estructura de compostos orgànics.

Per tal d'obtenir els espectres s'ha fet servir un equip RMN model Bruker AMX-300 NMR, utilitzant com a referència interna el tetrametilsilà (TMS).

Les mostres estudiades han estat dissoltes en diversos dissolvents segons les necessitats. En el cas del 18ATMA-PGGA i el 18ATMP-PGGA, el dissolvent ha estat cloroform deuterat.

3.3.2. Espectroscòpia d'infraroig

L'anàlisi IR, ha estat l'altre mètode de caracterització utilitzat. S'ha fet servir un equip de la marca Perkin Elmer, model UATR TWO.

En primer lloc s'ha fet un escombrat del medi, per obtenir el valor del blanc, i així obtenir directament les mesures de les mostres.

3.3.3. Termogravimetria

La termogravimetria s'utilitza per estudiar la descomposició tèrmica d'un compost. Les mostres s'han analitzat amb un equip Mettler-Toledo TGA/DSC 1 Star System.

El termograma s'ha obtingut sota un flux de nitrogen de 20 ml/min, augmentant la temperatura de 25°C fins a 600°C a una velocitat d'escalfament de 10°C/min.

3.3.4. Calorimetria diferencial d'escombrat

L'anàlisi calorimètric diferencial d'escombrat ha estat realitzat amb un equip DSC-8000 de la marca Perkin Elmer, calibrat prèviament amb indi i zinc.

Per determinar les temperatures de fusió les mostres d'ambdós complexos, de masses entre 3 i 5 mg, s'han exposat a cicles d'escalfament-refredament a temperatures compreses entre -10 i 120°C, una velocitat de 10°C/min i una atmosfera inerta (N_2).

3.3.5. Cristal·lització isotèrmica

Per tal d'estudiar la cinètica de la cristal·lització dels complexos d'amoni i fosfoni s'ha sotmès una massa de mostra, d'entre 3 i 5 mg a un primer escalfament des de -10 fins a 120°C, un refredament des dels 120°C fins a la temperatura corresponent al pic del procés de cristal·lització del complex, s'ha mantingut la temperatura 30 minuts i finalment s'ha escalfat la mostra fins a 120°C. Tots aquests processos s'han produït a una velocitat de 10°C/min.

Els resultats s'han tractat utilitzant la teoria d'Avrami que analitza el fenomen des d'un punt de vista macroscòpic.

Aquesta teoria planteja un mecanisme de cristal·lització basat en el creixement circular dels cristalls, partint dels nuclis i estenent-se per tota la massa del polímer. Només és aplicable en mecanismes de cristal·lització primaris degut a que, un cop les esferulites contacten entre elles, la teoria considera un creixement lliure. [9]

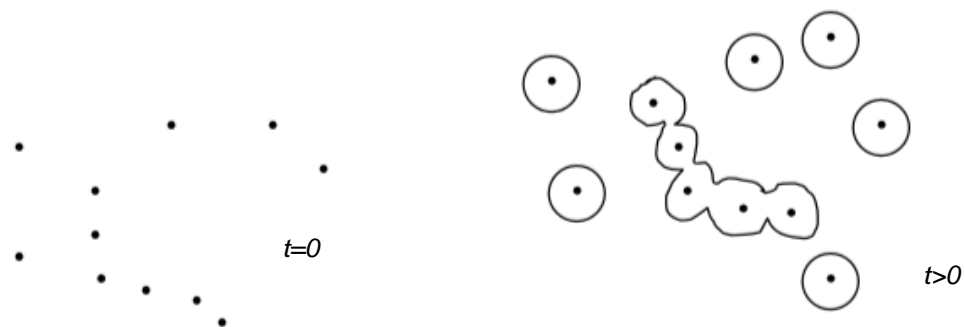


Figura 6: mecanisme de cristal·lització basat en el creixement circular dels cristalls

Avrami es basa en que la fracció de material no cristal·litzat, $1 - \Phi_c$, es pot calcular com la probabilitat de que, transcorregut un cert temps de cristal·lització, t , no hagi passat cap esferulita en creixement per un cert punt P.

$$e^{-E} = 1 - \Phi_c$$

On E és el nombre de fronts cristal·lins generats en el cristall, calculat per diferents tipus de cristal·lització: atèrmica amb creixement esfèric lliure, tèrmica amb creixement esfèric lliure, etc. Les equacions obtingudes tenen la forma següent:

$$1 - \Phi_c = \exp(-K \cdot t^n)$$

On n correspon a l'índex d'Avrami i pren diferents valors segons la geometria del creixement i les característiques tèrmiques del procés. Aquests han estat obtinguts empíricament i es poden observar a la taula següent. [10]

Geometria del creixement	<i>Nucleació heterogènia</i>	<i>Nucleació homogènia</i>
Unidimensional		
<i>Lineal</i>	1	2
Bidimensional		
<i>Circular</i>	2	3
Tridimensional		
<i>Esfèric</i>	3	4

Taula 3: Relació entre el paràmetre n de l'equació d'Avrami i la geometria de creixement

L'índex d'Avrami s'ha calculat utilitzant les expressions explicades anteriorment en forma logarítmica:

$$\ln(-\ln(1 - \Phi_c)) = n \cdot \ln(t - t_0) + \ln(K)$$

On a partir de la fracció de material no cristal·litzat i l'increment de temps, s'obtenen els coeficients n i K .

Un altre dels paràmetres calculats ha estat el temps de semicristal·lització, correspon al temps en què ha cristal·litzat un 50% de la massa total de cristalls formats. S'ha determinat gràficament, representant l'increment de temps enfront el percentatge de massa cristal·litzat.

3.3.6. Espectroscòpia Ultraviolada

Les absorbàncies de les diferents mostres s'han mesurat en un espectrofotòmetre UV-Visible CECIL CE 2021 (2000 Series), utilitzant sempre el mateix procediment per tal de normalitzar els resultats.

Després d'encendre l'aparell i ajustar la longitud d'ona a la de màxima absorbància de les mostres, 208 nm (*Taula 16*). Ha emprat el següent procediment:

- S'ha omplert la cubeta de quars amb la dissolució tampó i se n'ha mesurat l'absorbància. Un cop mesurada, s'ha fet el blanc per tal d'evitar efectes del tampó en la mesura següent.
- Un cop buidat el contingut de la cubeta s'ha emplenat amb la mostra, que conté el tampó i un tub de diàlisi amb el film del complex a dins. Posteriorment se'n mesura l'absorbància.

Per evitar possibles distorsions o pèrdues de calibrat de l'aparell, entre les diferents mesures s'ha tornat a fer el blanc.

A continuació s'indiquen les mostres i el material requerits per mesurar les absorbàncies:

- Cubeta de quars de 4 ml
- Dissolucions tampó
- Mostres en forma de film dels dos complexos.

3.3.7. Determinació de la dissociació de complexos en medis aquós a diferents pH

La capacitat que tenen els complexos de fosfoni i amoni de dissociar-se en un medi aquós, s'ha analitzat a partir de pel·lícules sòlides o films elaborats amb les mostres en forma de pols i utilitzant cloroform com a dissolvent.

Els films s'han obtingut pel mètode de *casting*. Consisteix en dipositar la dissolució de complex en cloroform en plaques Petri de 56 mm de diàmetre i posteriorment assecar-ho en un dessecador sotmès a pressió reduïda.

	<i>Volum CHCl₃ (ml)</i>	<i>Massa complex (mg)</i>
18 ATMP·PGGA	3	403,8
18ATMA·PGGA	3	397,2

Taula 4: volum de cloroform i massa de complex utilitzat per elaborar els films

Per dur a terme l'experiment s'han utilitzat porcions de film de forma quadrada amb una superfície total de 1 cm². En total s'han utilitzat sis porcions tallades prèviament amb l'ajuda d'unes tisores convencionals i una plantilla amb les mesures indicades.

El film del complex d'amoni presentava un acabat poc translúcid, compacte i no s'adheria als estris de treball quan es manipulava, resultava poc enganxós. En canvi el film sintetitzat a partir del complex de fosfoni mostrava un acabat molt més transparent, es trencava fàcilment i era difícil de manipular, adherint-se als estris contínuament.

El film del complex de fosfoni es va tornar a dissoldre un cop manipulat per tal d'aprofitar la mostra, ja que els talls sobrants presentaven una geometria poc favorable per a la seva reutilització.

Un cop obtinguts els films, s'ha mesurat la massa i el gruix de cadascun d'ells per així comprovar que les possibles divergències en els resultats no depenen de les seves característiques físiques.

Tot seguit cada film s'ha introduït en un tub de diàlisi, i aquest tub en un vial on més tard s'ha afegit el volum necessari de dissolució tampó per fer que cada mostra tingui una

concentració de 0,5 mg/ml de complex.

Preparació de dissolucions de diferents pHs

Per estudiar la dissociació en les mostres dels dos tipus de films de complexos obtinguts, s'han preparat una sèrie de dissolucions tampó a diferents pH, i així poder observar la influència que tenen diferents medis aquosos sobre la dissociació dels complexos.

S'ha seguit el mateix procediment experimental per a l'elaboració de totes elles. Després de pesar la massa necessària de cada compost en un paper de pesar, s'han abocat dins un vas de precipitats on més tard s'ha afegit un volum d'aigua destil·lada una mica inferior al necessari. Tot seguit s'ha deixat la dissolució 30 minuts en agitació, fins que no s'hi ha detectat restes de sòlid. Finalment s'ha transvasat el contingut del vas a un matràs aforat i s'ha acabat d'enrasar amb aigua destil·lada.

Els pH escollits, els volums d'aigua i les masses de cadascun dels compostos són els següents:

pH 5,5	pH 7,4	pH 9,6
<i>En 100 ml d'H₂O:</i>	<i>En 100 ml d'H₂O:</i>	<i>En 150 ml d'H₂O</i>
- 1,30 g KH_2PO_4	- 3 g Na_2HPO_4	- 420 mg $NaHCO_3$
- 130 mg Na_2HPO_4	- 272 mg KH_2PO_4	- 40 mg NaOH

Taula 5: volum d'aigua i masses de reactius utilitzats per preparar les diferents dissolucions

3.3.8. Anàlisi de l'activitat antimicrobiana del 18ATMP·PGGA i del 18ATMA·PGGA

La mesura de l'activitat antimicrobiana pretén obtenir informació a nivell qualitatiu i quantitatiu del comportament dels complexos 18ATMA·PGGA i 18ATMP·PGGA, en presència de bacteris. En aquest cas s'ha utilitzat el bacteri *Gram*-negatiu *Escherichia coli*

ATCC 9001 i el *Gram*-positiu *Staphylococcus aureus*.

L'anàlisi s'ha realitzat mitjançant el mètode en medi líquid que s'encarrega de quantificar aquesta l'activitat biocida.

Les soques bacterianes han estat emmagatzemades en cultiu líquid de Triptona-Soja (TSB) amb un 20% de glicerol i a una temperatura de -80°C. Per a la seva utilització al laboratori, les mostres s'han mantingut en cultius sòlids d'agar Triptona-Soja (TSA).

Per a preparar el cultiu bacterià, un *loopful* de mostra ha estat transferit a 10 mL de TSB i el cultiu líquid ha estat incubat a 37°C durant 18h. Un *loopful* correspon a una nansa d'inoculació carregada, que equival a uns 5 µL de mostra, aproximadament.

· Mètode líquid

L'activitat antimicrobiana dels films ha estat analitzada mitjançant el mètode de difusió en agar. S'ha preparat un cultiu bacterià amb cèl·lules en fase estacionària i TSB, que va ser incubat a 37°C fins que van arribar a la seva fase exponencial de creixement. En aquest moment en cinc tubs diferents, s'ha col·locat un volum de 100 µL d'aquest TSB, amb 10⁵ cfu/mL.

En aquests cinc tubs s'hi han abocat diferents compostos dels quals se'n vol estudiar l'activitat biocida: PGGA·Na, 18ATMA·Br, 18ATMP·Br, 18ATMA·PGGA i 18ATMP·PGGA.

En el cas dels complexos i del PGGA s'han utilitzat films d'1 cm² de superfície, i en el cas del tensioactius una massa d'1 mg.

Passades 2 hores s'han dut a terme dilucions seriades; 5 tubs Eppendorf s'han preparat amb 900 µL d'aigua peptonada cadascun. Del cultiu bacterià prèviament preparat, 100 µL de cadascun dels tubs s'han transferit als diferents Eppendorfs. Per tal d'aconseguir les diferents dilucions d'interès s'ha seguit el procediment explicat a la següent figura.

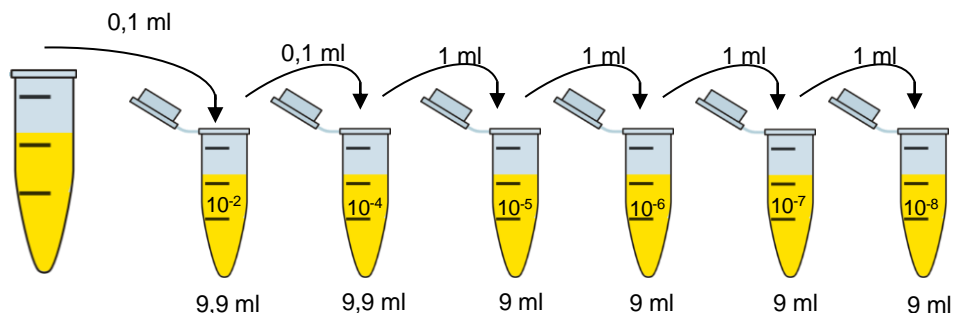


Figura 7: procediment experimental utilitzat per elaborar dilucions

Finalment cadascuna de les dilucions s'ha sembrat per extensió en superfície en plaques TSA. Aquest últim procediment s'ha realitzat per triplicat. A més a més s'ha realitzat l'experiment passades 2,4 i 24 hores de incubació.

L'objectiu de les dilucions és principalment, que es puguin contar el nombre de colònies de bacteris que apareixen un cop sembrat i incubat durant 24 hores a 37°C i els valors escollits per cadascuna de les mostres i per els dos bacteris es recullen a la taula següent:

DILUCIONS ESCOLLIDES

	<i>Staphylococcus Aureus</i>			<i>Escherichia Coli</i>		
	2 h	4 h	24 h	2 h	4 h	24 h
18ATMA·PGGA	-5/-6	-6/-7	-6/-7	-5/-6	-6/-7	-6/-7
18ATMP·PGGA	-5/-6	-6/-7	-6/-7	-5/-6	-6/-7	-6/-7
18ATMA·Br	-5/-6	-6/-7	-6/-7	-3/-4	-6/-7	-6/-7
18ATMP·Br	-3/-4	-5/-6	-5/-6	-3/-4	-5/-6	-5/-6
PGGA	-3/-4	-5/-6	-5/-6	-3/-4	-5/-6	-5/-6

Taula 6: valors de dilució escollits per sembrar en cadascun dels temps i els bacteris escollits

4. RESULTATS

4.1. Síntesi i preparació dels complexos

Les característiques de la síntesi dels dos complexos es resumeixen a la taula següent:

18ATMA-PGGA	Lot 1	18ATMP-PGGA	Lot 1
<i>Data</i>	20/02/2018	<i>Data</i>	31/01/2018
<i>Temps de reacció (h)</i>	4	<i>Temps de reacció (h)</i>	4
<i>Pes ideal (mg)</i>	1013,43	<i>Pes ideal (mg)</i>	1143,88
<i>Pes final (mg)</i>	732,9	<i>Pes final (mg)</i>	1019,3
<i>Rendiment (%)</i>	72,32	<i>Rendiment (%)</i>	89,11

Taula 7: masses i rendiments obtinguts per cadascuna de les síntesis

Els dos complexos han estat preparats a partir d'una mescla estequiomètrica (1:1) dels tensioactius 18ATMP-Br i 18ATMA-Br amb la sal Na-PGGA, dissolts en aigua a una temperatura que superi la T_{KRAFFT} , per garantir així la total dilució.

Amb la massa obtinguda de cadascun dels complexos ha estat suficient per poder realitzar totes les proves i experiments.

Pel que fa als rendiments, considerant que el temps de reacció ha estat el mateix en les dues síntesis divergeixen considerablement. Tot i ser rendiments alts, aquesta diferència pot ser causada per les pèrdues de producte a l'hora de filtrar el complex, la diferent solubilitat dels compostos a les temperatures en les que s'ha realitzat l'experiment i a la dificultat de la manipulació de les mostres.

4.2. Caracterització química dels complexos

4.2.1. Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear

Per tal de confirmar l'estructura dels complexos d'amoni i fosfoni, i calcular la seva estequiometria, s'ha realitzat l'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear d'hidrogen utilitzant com a dissolvent cloroform deuterat. El seu senyal de desplaçament químic no apareix a l'espectre ja que té valor $\delta=7,2$ ppm.

El procediment utilitzat per determinar l'estructura dels complexos ha estat la següent. En primer lloc s'ha relacionat cada senyal de l'espectre als diferents hidrògens presents al complex. A continuació s'ha integrat l'àrea que hi ha per sota de cada senyal per tal de comprovar si el seu valor coincideix o és proper al nombre d'hidrògens teòric.

Pel que fa a l'estequiometria, inicialment s'ha de donar el valor de 1 a una de les àrees integrades. Com a referència s'ha atribuït el valor 1 a l'àrea del pic "alfa-CH", ja que conté un hidrogen.

18ATMP·PGGA

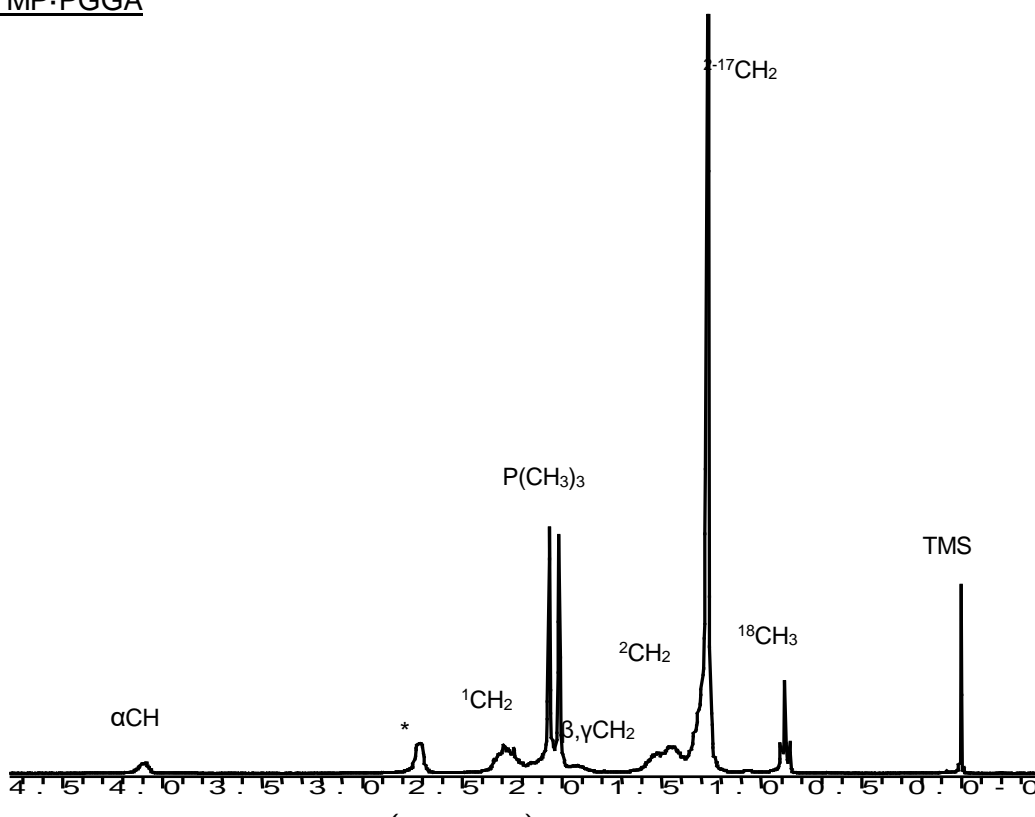


Figura 8: espectre ^1H -RMN del complex 18ATMP·PGGA

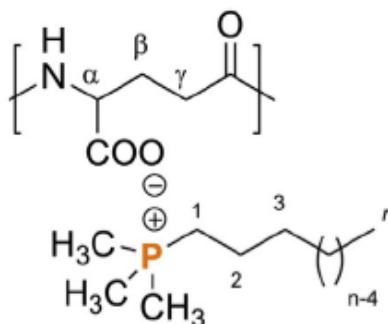


Figura 9: fórmula del 18ATMP-PGGA

Senyal	Nº Hidrògens	Valor Integral	Proporció
αCH	1	1	1
$\text{P}(\text{CH}_3)_3 + {}^1\text{CH}_2$	11	12,96	1,18
${}^{2-17}\text{CH}_2$	32	37,13	1,16
${}^{18}\text{CH}_3$	3	2,49	0,83

Taula 8: nombre d'hidrògens teòrics i valor de la integral de l'àrea obtingut, en el cas del 18ATMP-PGGA

Per obtenir la proporció, s'ha de dividir el valor de la integral pel nombre d'hidrògens de cadascun dels senyals.

En aquest cas, el valor d'aquestes proporcions són: 1,18, 1,16 i 0,83. Per tant la composició del complex és 1,1:1 (18ATMA : PGGA).

18ATMA·PGGA

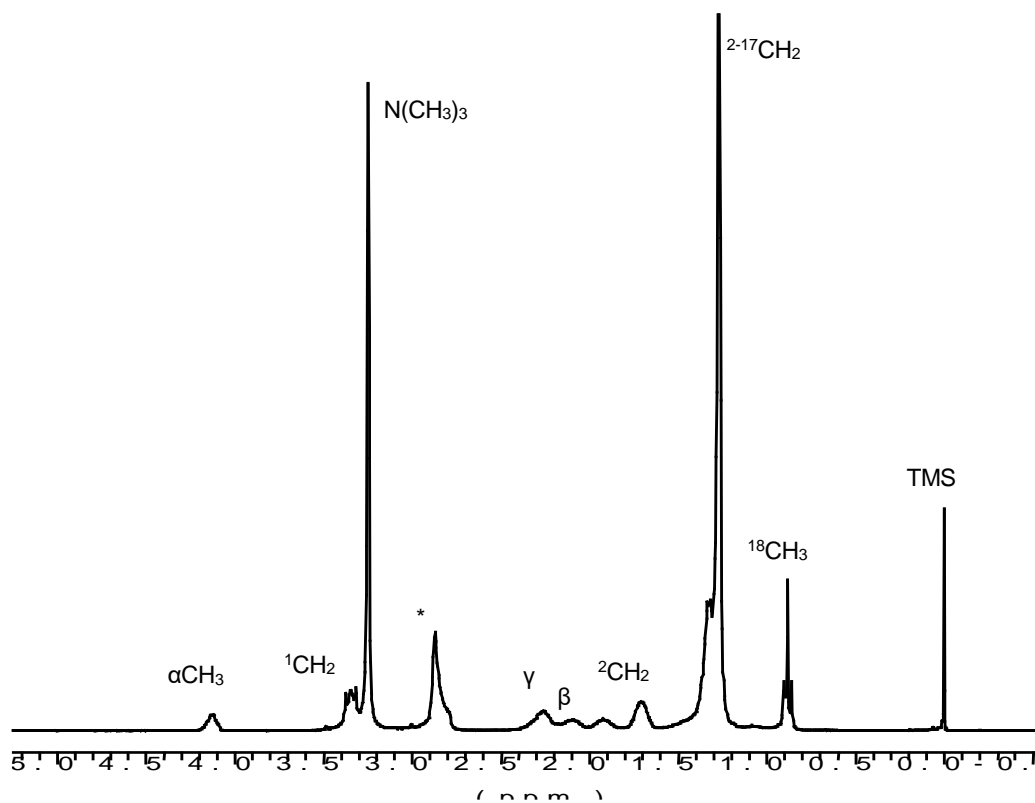


Figura 10: espectre H-RMN del complex 18ATMA·PGGA

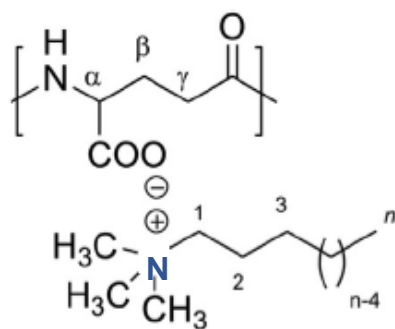


Figura 11: fórmula del 18ATMA·PGGA

<i>Senyal</i>	<i>Nº Hidrògens</i>	<i>Valor Integral</i>	<i>Proporció</i>
αCH	1	1	1
$\text{N}(\text{CH}_3)_3 + {}^1\text{CH}_2$	11	13,01	1,18
${}^{2-17}\text{CH}_2$	32	39,13	1,22
${}^{18}\text{CH}_3$	3	2,73	0,91

Taula 9: nombre d'hidrògens teòrics i valor de la integral de l'àrea obtingut, en el cas del 18ATMA·PGGA

Les proporcions s'han obtingut seguint el mateix procediment que pel complex anterior. La composició del complex és 1,1:1 (18ATMA : PGGA).

4.2.2. Espectroscòpia d'infraroig

L'espectroscòpia d'infraroig s'utilitza principalment per identificar els grups funcionals dels compostos o per investigar la composició d'una mostra.

A la zona de l'espectre electromagnètic IR amb longituds d'ona de l'infraroig mitjà, entre 4000 i 1300 cm^{-1} , s'observen bandes d'absorció provocades per les vibracions entre dos àtoms de la molècula. Aquestes vibracions deriven de grups que contenen hidrogen o grups amb dobles o triples enllaços aïllats.

A la zona de l'infraroig llunya, entre 1300 i 400 cm^{-1} , l'assignació de les bandes d'absorció a vibracions moleculars són més difícils de realitzar, degut principalment a que cada una d'elles està generada per absorcions individuals sumades. Aquesta zona es denomina empremta dactilar.

El mecanisme que fa servir aquesta tècnica es basa en l'emissió d'un raig de llum infraroja monocromada a una longitud d'ona concreta a través de la mostra i el posterior registre a l'espectre de la quantitat de llum que és transmesa. Aquests valors depenen de la semblança energètica entre les molècules de la mostra i el raig de llum emès.

El procediment explicat es repeteix a tot el rang de valors de longitud d'ona que es vulgui estudiar, en aquest cas s'ha realitzat entre els 4000 cm^{-1} i els 400 cm^{-1} .

S'ha analitzat l'estructura dels tensioactius, els complexos i el PGGA. A continuació es presenten els seus espectres:

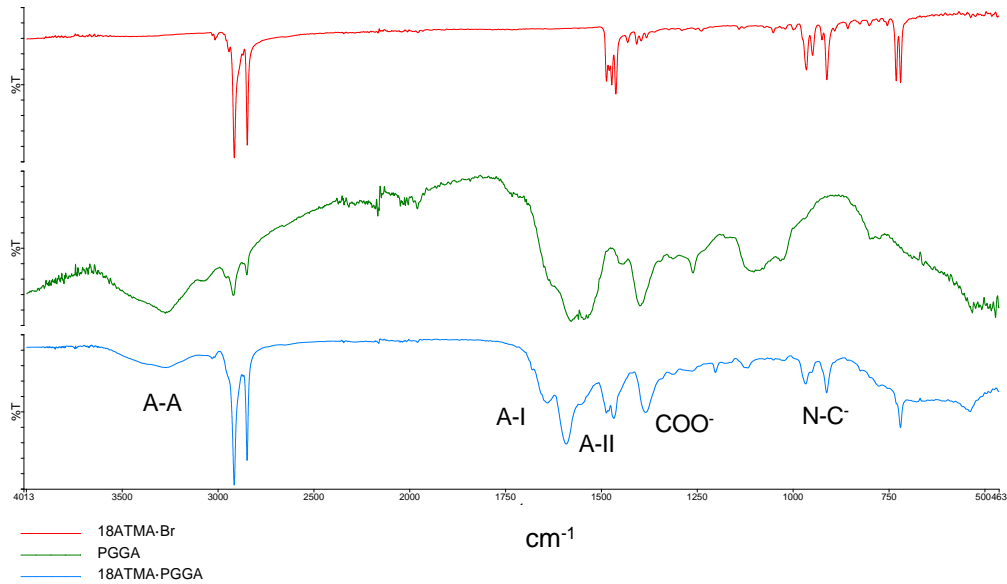


Figura 12: espectres IR del PGGA, el 18ATMA·Br i el 18ATMA·PGGA

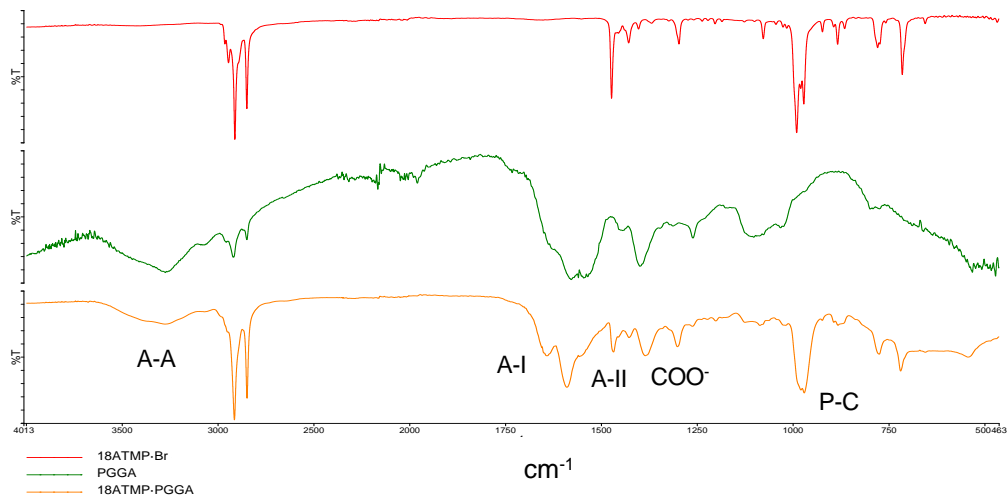


Figura 13: espectres IR del PGGA, el 18ATMP·Br i el 18ATMP·PGGA

A l'espectre dels tensioactius es poden observar diverses bandes que corresponen als diferents tipus d'enllaços C-H.

En primer lloc, s'observen dos pics al voltant dels 2900 i 2800 cm^{-1} provocats per l'enllaç C-H de tensió. Més endavant, a prop dels 1450 cm^{-1} es situen les bandes corresponents als enllaços C-H de deformació. A nivell teòric el pic provocat per la deformació simètrica es situa als 1450 cm^{-1} i el de la asimètrica als 1380 cm^{-1} . Per últim a 720 cm^{-1} , apareix un pic que correspon a l'enllaç C-H de deformació.

Pel que fa als enllaços P-C i N-C, estan situats a uns 900 cm^{-1} . Corresponen a una vibració que en el cas del tensioactiu de fosfoni resulta més intensa.

	C-H tensió	C-H def 1	C-H def 2	N/P - H
<i>18ATMA·Br</i>	2916 i 2848	1462	730	911
<i>18ATMP·Br</i>	2913 i 2851	1473	714	990

Taula 10: valors del nombre d'ona dels diferents grups funcionals dels tensioactius

A l'espectre de PGGA es poden observar tres bandes que caracteritzen a la amida. La primera, anomenada Amida A correspon a l'enllaç N-H de tensió i com es pot observar a la Taula x es situa al voltant dels 3200 cm^{-1} , la segona banda, que rep el nom de Amida I, es situa al voltant dels 1600 cm^{-1} i correspon a l'enllaç C=O de tensió, per últim la tercera banda, Amida II, representa l'enllaç N-H de flexió i esta situada als 1500 cm^{-1} .

Un altre dels pics a destacar de l'espectre és el corresponent al COO^- . Aquesta banda està situada al voltant dels 1590 cm^{-1} i és producte d'una tensió asimètrica, però a l'espectre s'observen de manera solapada.

	<i>Amida A</i>	<i>Amida I</i>	<i>Amida II</i>	<i>COO⁻</i>
<i>18ATMA·PGGA</i>	3277,20	1629,80	1544	1578,05
<i>18ATMP·PGGA</i>	3277,56	1642,93	1546	1591,57
<i>PGGA</i>	3276,20	1629,80	1544	1579,05

Taula 11: valors del nombre d'ona dels diferents grups funcionals dels complexos i el PGGA

Els espectres dels dos complexos, com es pot observar, corresponen a una suma dels del PGGA i el tensioactiu corresponent, tot i que alguns pics no s'observen amb la mateixa intensitat ni definició. Aquesta coincidència indica que a l'estructura dels complexos no hi ha impureses destacables, fet que confirma la informació que ens dona l'H-RMN.

4.3. Propietats tèrmiques dels complexos

4.3.1. Termogravimetria

L'anàlisi termogravimètrica del 18ATMA·PGGA i el 18ATMP·PGGA proporciona informació sobre l'estabilitat tèrmica dels complexos.

Partint d'una massa de complex d'entre 10 i 15 mg, s'ha realitzat un escalfament des de 25 a 600°C sota un flux de nitrogen de 20 ml/min i una velocitat d'escalfament 10°C/min.

La termogravimetria permet saber a quina temperatura es comença a degradar la mostra, a quina temperatura es produeix una pèrdua de massa superior i en quantes etapes es produeix el procés de descomposició de la mostra.

Els resultats obtinguts indiquen que s'ha produït una descomposició d'ambdós complexos dividida en dues etapes. Aquestes fases s'han produït a temperatures dels 170 i 340 °C en el cas del 18ATMA·PGGA i temperatures de 275 i 450 °C en el cas del 18ATMP·PGGA.

Durant la primera d'aquestes dues etapes, que és la majoritària es produeix una despolimerització de la cadena principal a través d'un mecanisme de ciclació, convertint-se

així en un derivat de l'àcid piroglutàmic. El segon pas de la descomposició, representat amb un pic menor, correspon a la descomposició tèrmica de la cadena lateral del tensioactiu. [11]

	$T_d(^{\circ}\text{C})$	$T_{m1}(^{\circ}\text{C})$	$T_{m2}(^{\circ}\text{C})$	%Pes restant
18ATMA-PGGA	218	268	323	0
18ATMP-PGGA	307	332	380	4,94

Taula 12: Dades obtingudes de la termogravimetria dels complexos: temperatura d'inici de la degradació tèrmica (T_d), temperatures de màxima velocitat de degradació de les dues etapes (T_{m1} i T_{m2}) i percentatge de massa que resta al final de l'escalfament.

En el cas del 18ATMA-PGGA, un cop acabada la primera fase de degradació tèrmica, ja s'ha reduït la massa de la mostra en aproximadament un 90% del seu pes inicial. Mentre que al final del procés, ha desaparegut el que restava de massa.

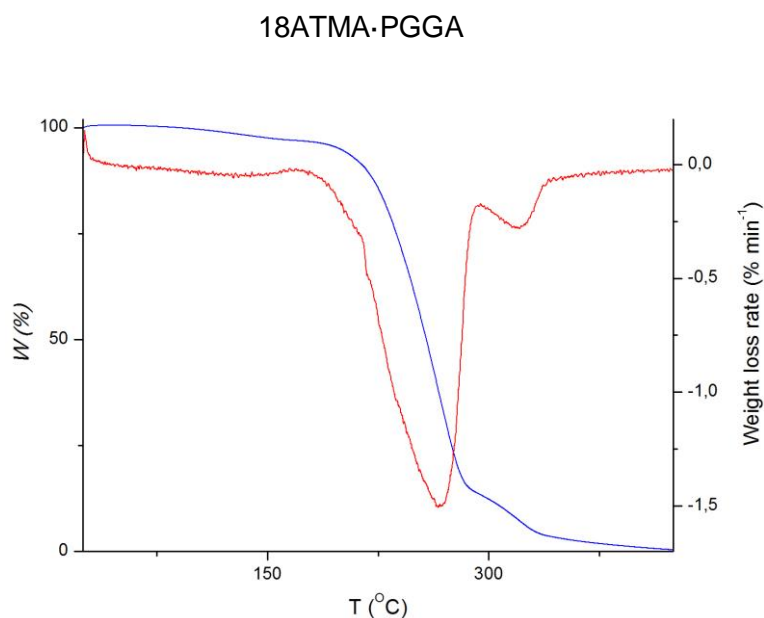


Figura 14: corba de degradació del complex 18ATMA-PGGA. En blau es representa la pèrdua percentual de pes i en vermell, la derivada de la pèrdua percentual de pes respecte al temps

En canvi en el cas del 18ATMP·PGGA, durant la primera fase es degrada aproximadament un 80% de la massa inicial, i un cop acabat el procés resta un 4% de la massa inicial, és a dir, no es degrada totalment la mostra.

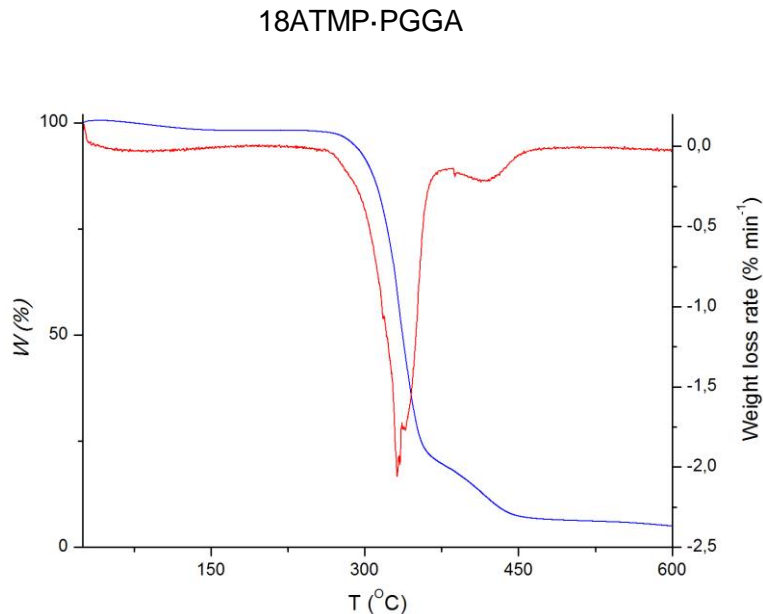


Figura 15: corba de degradació del complex 18ATMP·PGGA. En blau es representa la pèrdua percentual de pes i en vermell, la derivada de la pèrdua percentual de pes respecte al temps

4.3.1. Calorimetria diferencial d'escombrat

La calorimetria diferencial d'escombrat permet estudiar processos on es produeixen transicions tèrmiques.

L'objectiu principal de l'estudi ha estat determinar les característiques de dues transicions tèrmiques: la fusió i la cristal·lització.

La tècnica DSC, a part de la càpsula on hi ha la mostra, utilitza una altra càpsula buida per tal de comparar la diferència d'absorció o d'alliberació de calor entre els forns on hi ha les càpsules, a mesura que varia la temperatura. És aquesta diferència d'energia la que aporta informació sobre el comportament de la mostra.

4.3.1.1. Determinació de les temperatures de fusió i cristal·lització

Per tal d'observar quina és la temperatura de fusió dels dos complexos estudiats s'ha realitzat un primer escalfament de -10 a 120 °C. A continuació s'ha mantingut el complex 5 min a 120 °C per esborrar la memòria tèrmica del complex. La temperatura de cristal·lització s'observa mitjançant un refredament de 120 a -10 °C. Per últim se sotmet la mostra a un segon escalfament fins a 120 °C. Aquests processos s'han realitzat a partir d'una massa de mostra d'aproximadament 5 mg i a una velocitat de 10 °C/min.

Durant el primer escalfament, en el cas del 18ATMA·PGGA, s'observa un pic a 54 °C que correspon a la fusió de les cadenes alquíliques de tensioactiu. Tot seguit hi ha un pic de dimensions menors, al voltant dels 65 °C. Correspon a la fusió de restes de tensioactiu presents a l'estructura del complex.

Posteriorment, durant el refredament, cristal·litzen parcialment les cadenes del tensioactiu.[12] És un procés ràpid que es localitza a 24 °C mitjançant un pic de mida inferior al de la primera fusió. Es tracta d'un pic exotèrmic de menor entalpia, en valor absolut, aquest fet és degut principalment a la rapidesa amb què esdevé el procés.

Per últim, durant el segon escalfament s'ha produït una fusió, produïda a menys temperatura que la primera fusió. Fonen principalment les parts que han cristal·litzat anteriorment. Aquesta fusió es produeix a 29 °C.

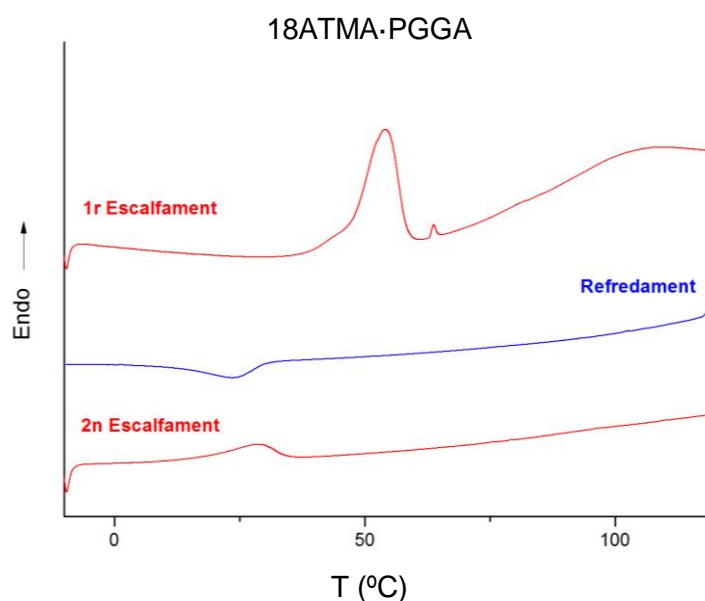


Figura 16: calorimetria del complex 18ATMA·PGGA

En el cas del 18ATMP-PGGA, el procediment és molt similar, tret de les temperatures en les que es produeixen els diferents fenòmens de fusió i cristal·lització.

Durant el primer escalfament s'observa un pic corresponent a la fusió del compost que està situat a 49 °C, essent així una temperatura de fusió inferior a la del complex d'amoni. En aquest cas, és l'únic pic present durant el primer escalfament.

Pel que fa al refredament, la cristal·lització es produeix a una temperatura de 22 °C, també inferior a la temperatura de cristal·lització del 18ATMA-PGGA.

Per últim, durant el segon escalfament apareix un pic de dimensions menors al de la primera fusió i a una temperatura de 29 °C.

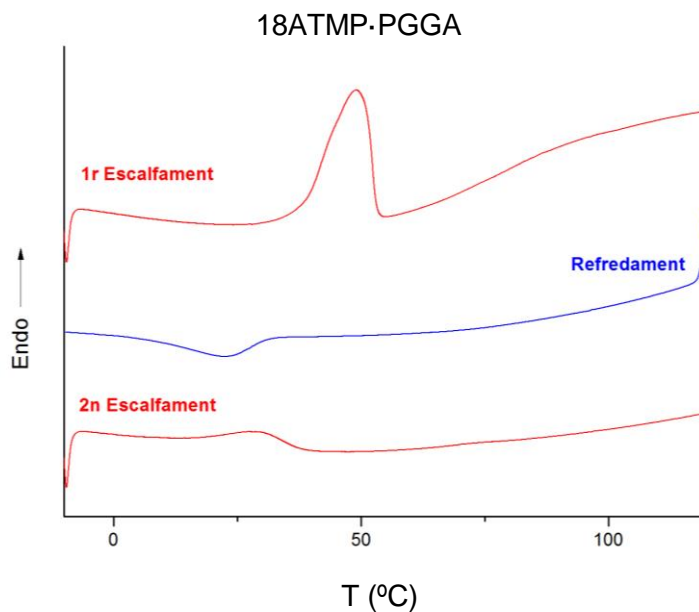


Figura 17: calorimetria del DSC del complex 18ATMP-PGGA

	1r escalfament		Refredament		2n escalfament	
	T_{m1}	ΔH_{m1}	T_c	ΔH_c	T_{m2}	ΔH_{m2}
<i>18ATMA-PGGA</i>	54	7,3	24	-1,7	29	1,1
<i>18ATMP-PGGA</i>	49	5,0	22	-1,3	29	0,8

Taula 13: temperatures de fusió (T_{m1} i T_{m2}) i cristal·lització (T_c) ($^{\circ}\text{C}$) i calors bescanviats durant les fusions i la cristal·lització (kcal/mol)

4.3.1.2. Cristal·lització isotèrmica

L'objectiu principal d'estudiar la cinètica de cristal·lització dels complexos 18ATMA-PGGA i 18ATMP-PGGA, ha estat determinar la geometria de creixement dels cristalls i conèixer com afecta la temperatura al procés de cristal·lització.

La determinació empírica de l'exponent n de l'equació d'Avrami permet identificar la geometria de creixement dels cristalls, tal i com s'observa a la *Taula 3*. Altres constants calculades han estat el temps de semicristal·lització i la constant de cristal·lització d'Avrami.

El procés tèrmic al que s'han sotmès les diferents mostres, d'entre 3 i 5 mg, ha estat el següent:

- S'ha escalfat la mostra des de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocitat de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, tot seguit s'ha mantingut la mostra a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant cinc minuts per tal d'esborrar l'historial tèrmic.
- S'ha refredat la mostra a la mateixa velocitat fins a una temperatura compresa entre la temperatura de cristal·lització i la temperatura de fusió calculades anteriorment a l'*Apartat 4.3.2.1*.
- Seguidament la mostra s'ha mantingut durant 15 minuts a la temperatura escollida, en aquest procés és quan té lloc la cristal·lització.

- Finalment s'ha escalfat la mostra a una velocitat de 10 °C/min fins a 120 °C.

Aquest experiment s'ha realitzat per triplicat en el cas del 18ATMP-PGGA situant la isoterma a diferents temperatures per valorar l'efecte d'aquesta. Aquestes temperatures han estat 23, 28 i 34 °C. En el cas del 18ATMA-PGGA el rang de temperatures a escollir era menor, és per això que el procés s'ha realitzat per duplicat situant la isoterma a 26 i 28 °C.

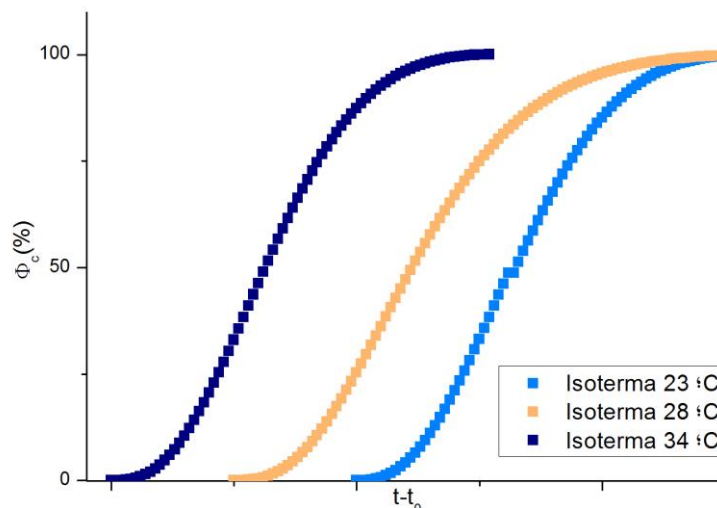
Per tal d'obtenir les dades que en permeten calcular els paràmetres n i K , s'ha integrat la corba de cristal·lització del gràfic que mostra l'intercanvi de calor en funció del temps, obtenint així el temps en minuts, l'àrea en mJ i el percentatge de mostra cristal·litzada respecte la massa total que s'ha cristal·litzat, per cada increment de temps.

Un cop obtingudes les dades, en cada cas s'han representat dues gràfiques:

- Una primera on s'observa el percentatge de material cristal·litzat respecte el que finalment s'ha cristal·litzat, en funció de l'increment de temps.
- A la segona es representa l'equació en forma logarítmica explicada a l'*Apartat 3.5.5*. Per tal d'obtenir aquesta equació s'utilitzen els punts que asseguren un millor ajust a l'hora d'aplicar una regressió lineal i aquests punts són els que es representen també a la gràfica.

En el cas del complex de fosfoni, quan s'ha realitzat la cristal·lització isotèrmica els resultats han estat aquests:

18ATMP-PGGA



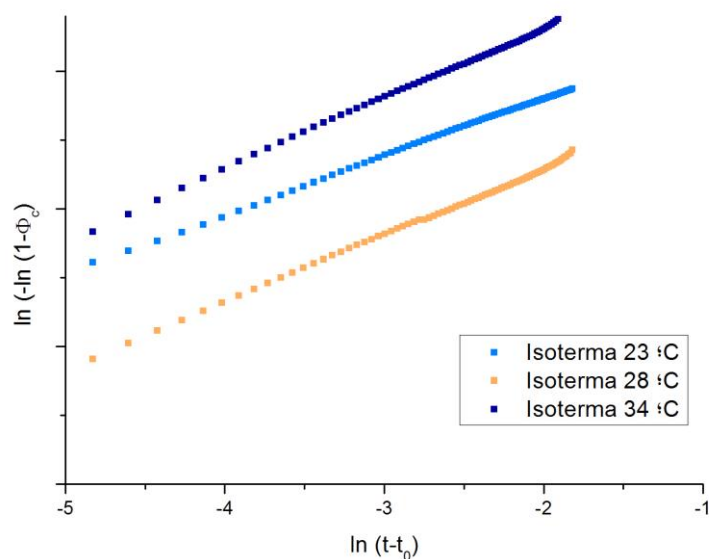
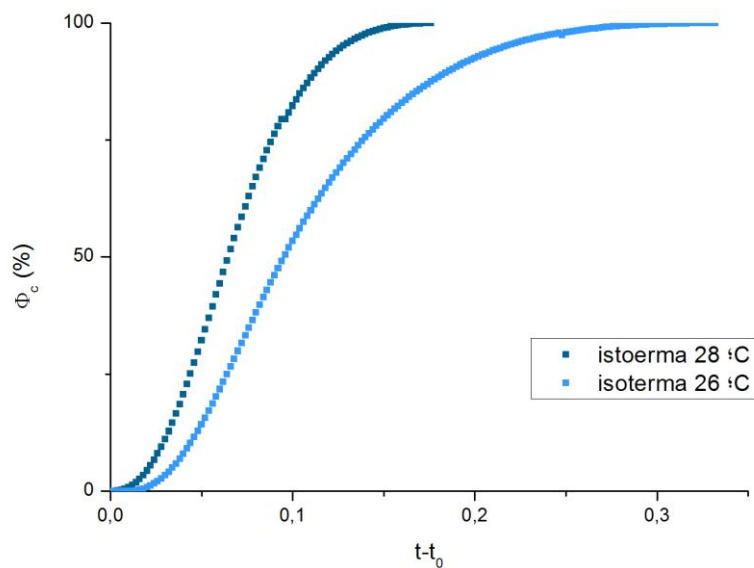


Figura 18: gràfiques representades per tal d'obtenir les constants de l'equació d'Avrami de 18ATMP-PGGA

En el cas del complex d'amoni quan s'ha realitzat la cristallització isotèrmica els resultats han estat aquests:

18ATMA-PGGA



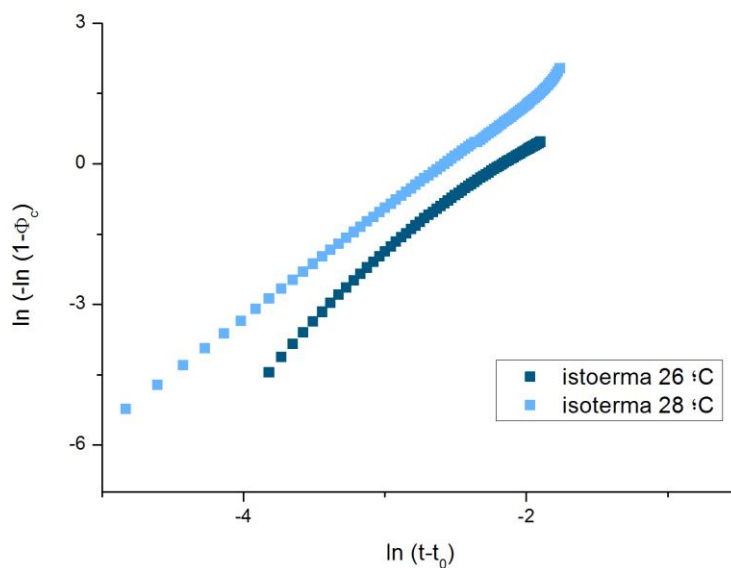


Figura 19: gràfiques representades per tal d'obtenir les constants de l'equació d'Avrami de 18ATMA-PGGA

A continuació es presenta una taula resum amb els valors calculats dels coeficients d'Avrami n i K i el temps de semicristal·lització $t_{1/2}$:

	18ATMA-PGGA		18ATMP-PGGA		
	26 °C	28 °C	23 °C	28 °C	34 °C
n	2,42	2,41	2,72	2,45	2,67
$\ln K$	5,26	6,12	6,92	5,82	6,88
$t_{1/2} (s)$	5,9	5,4	5,4	5,4	4,8

Taula 14: valors dels paràmetres d'Avrami " n " i " $\ln K$ " i del temps de semicristal·lització, on les unitats de la K són min^{-n}

Gràcies a l'anàlisi de la cristal·lització isotèrmica dels complexos, s'han determinat les

constants d'Avrami que indiquen que el mecanisme de nucleació i creixement cristal·lí es produeix de manera molt ràpida i similar en ambdós casos. El valor de l'exponent de l'equació d'Avrami per als dos complexos té un valor comprés 2 i 3.

4.4. Estudi de la dissociació dels complexos en medi aquós

L'objectiu d'aquest experiment és determinar els factors que afecten la dissociació dels complexos 18ATMP-PGGA i 18ATMA-PGGA en diferents medis aquosos, mitjançant mesures d'absorbància de la dissolució que conté el film cada certs períodes de temps.

El film no està en contacte directe amb el medi, sinó que es troba a l'interior d'un saquet de diàlisi. Aquest sac té com a funció deixar passar molècules amb un pes molecular menor a 14000 g/mol, en aquest cas deixa que el tensioactiu passi i que el polímer no pugui traspasar el sac de diàlisi.

S'han obtingut films de cadascun dels complexos, de forma quadrada i superfície de 1 cm² i se n'ha estudiat la dissociació en medis a pH 5,5, 7,4 i 9,6.

El sac de diàlisi s'ha dipositat dins un vial, juntament amb el volum de dissolució corresponent. L'experiment s'ha realitzat a temperatura ambient, agitant suaument el vial abans de cada mesura d'absorbància i un cop feta la mesura, s'ha retornat el volum de dissolució al mateix vial, per tal de no modificar la concentració de la mostra.

Les característiques de cada film i el volum de dissolució tampó afegit en cada cas es presenten a la taula següent:

Films 18ATMP-PGGA				Films 18ATMA-PGGA		
	Massa (mg)	Gruix (μ m)	V _{diss} (ml)	Massa (mg)	Gruix (μ m)	V _{diss} (ml)
1	13,8	0,120	6,65	13,1	0,148	6,55
2	16,8	0,140	8,4	16,1	0,132	8,05
3	14,5	0,145	7,25	15,1	0,156	7,55

Taula 15: característiques físiques de cadascun dels films utilitzats durant l'experiment

Els períodes de temps escollits per a fer les mesures d'absorbància de les solucions on hi ha submergits els films han estat: 1, 2, 4, 7 hores; i 1, 2 i 5 dies. La majoria de mesures s'han fet durant el primer dia, ja que és quan hi ha una major dissociació dels complexos.

4.4.1. Determinació de la longitud d'ona de màxima absorció

Per tal de determinar la longitud d'ona de màxima absorció de cadascuna de les dissolucions tampó utilitzades durant l'experiment s'ha mesurat l'absorbància realitzant un escombrat des d'una longitud d'ona de 400 nm fins a 190 nm.

Per valorar l'efecte del tensioactiu també s'han fet mesures d'absorbància d'una mescla formada per les dissolucions tampó i cadascun dels tensioactius.

Els valors obtinguts es representen a la taula següent:

	<i>pH</i>	<i>Sense tensioactiu</i>	<i>18ATMA·Br</i>	<i>18ATMP·Br</i>
$\lambda_{\text{màx}}$ (nm)	5,5	205,5	204,5	205,5
	7,4	206	205	206
	9,6	209,6	210	209,6

Taula 16: longitud d'ona de màxima absorció de cadascun dels diferents medis utilitzats

No existeixen grans diferències entre longituds d'ona de màxima absorbància, és per això que s'ha decidit utilitzar una longitud d'ona de 208 nm per mesurar totes les absorbàncies.

4.4.2. Determinació de l'absorbància

Seguint el procediment explicat a l'*apartat* 3.3.6. s'han obtingut els valors d'absorbància de cadascuna de les mostres preparades.

Mesures d'absorbància

<i>pH</i>	Mostra	1	2	3	4	5	6	7
5,5	ATMA	0,902	0,950	1,054	1,070	0,918	0,686	0,576
	ATMP	1,022	1,120	1,188	1,182	1,106	0,887	0,755
7,4	ATMA	0,889	0,954	0,982	1,002	0,876	0,654	0,500
	ATMP	0,867	0,891	0,900	0,902	0,831	0,704	0,544
9,6	ATMA	0,415	0,504	0,590	0,623	0,807	1,040	1,278
	ATMP	0,605	0,705	0,793	0,815	0,981	1,226	1,452

Taula 17: valors d'absorbància per cadascuna de les mesures i els medis aquosos

4.4.3. Influència del pH

S'han sotmès els films de cada complex a medis aquosos a diferents pHs amb la intenció de valorar l'efecte del medi en el procés de dissociació del complex.

18ATMA-PGGA

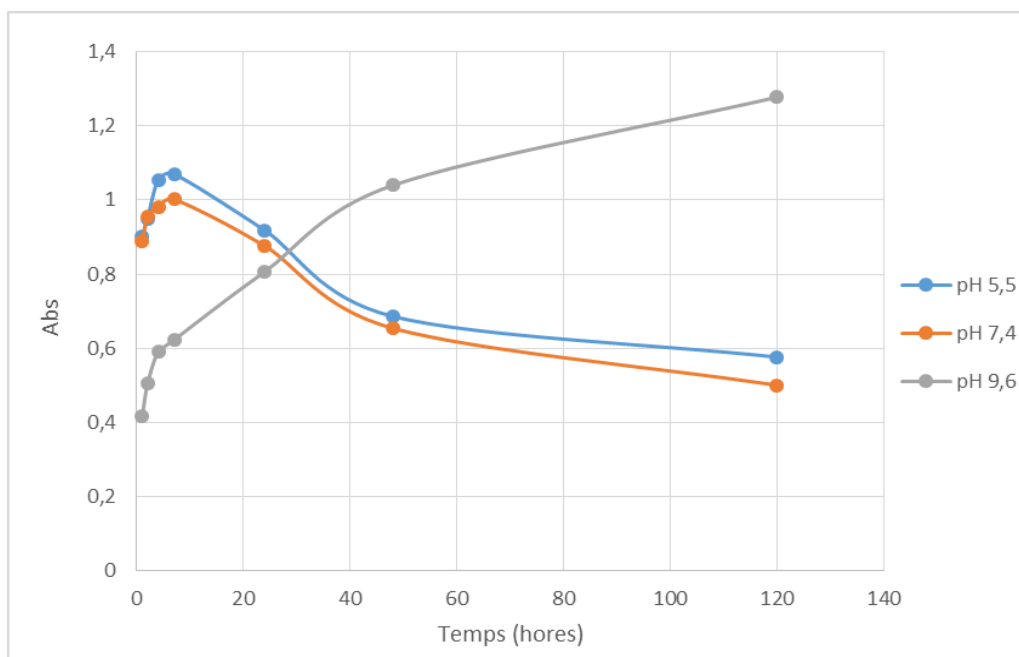


Figura 20: gràfica que mostra la variació de l'absorbància respecte el temps de les dissolucions que contenen els films de 18ATMA-PGGA

Durant tot el període en què el film està submergit a pH bàsic hi ha un augment d'absorbància, cosa que indica que va augmentant la dissociació del complex que forma el film. El mateix passa durant el primer dia si el film està submergit en medi àcid o en medi neutre. A temps més llargs d'exposició en aquests medis, es produeix una disminució progressiva d'absorbància que podria ser causada per agregació del tensioactiu en forma de micel·les.

18ATMP-PGGA

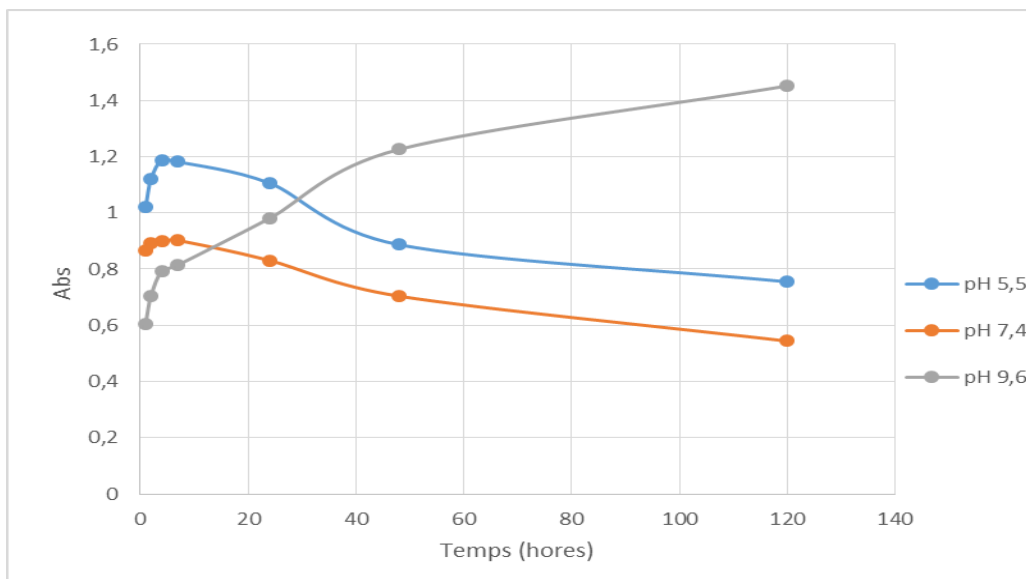


Figura 21: gràfica que mostra la variació de l'absorbància respecte el temps de les dissolucions que contenen els films de 18ATMP-PGGA

En el cas dels films de 18ATMP-PGGA, la seva interacció amb el medi presenta una tendència semblant a la dels films del complex d'amoni. Per al complex de fosfoni la diferència entre la dissociació a pH àcid i a pH neutre és més gran que per al complex d'amoni.

4.4.4. Influència del tensioactiu

Gràcies a realitzar l'experiment introduint els films en un saquet de diàlisi, s'aconsegueix

que les variacions d'absorbància de les diferents mostres siguin provocades únicament per la contribució del tensioactiu, ja que la porositat del sac de diàlisi no permet que el PGGA el traspassi. És per això que es pot avaluar la influència del tensioactiu, assegurant que no afecta en les mesures el PGGA.

Com es pot observar a la *Taula 17*, els valors d'absorbància de les dissolucions que contenen films del complex 18ATMP-PGGA són lleugerament superiors a les que contenen films del complex 18ATMA-PGGA.

4.5. Anàlisi de l'activitat antimicrobiana dels complexos

Per tal de poder quantificar l'activitat biocida dels complexos, els tensioactius i el PGGA s'han preparat diferents dilucions seriades que han estat sembrades per extensió en superfície en plaques TSA.

Aquestes dilucions un cop sembrades a les plaques s'han incubat durant 24 hores a 37 °C. Passat aquest temps s'han format una sèrie de colònies que s'ha comptabilitzat per tal de quantificar les unitats de colònies formades (CFU).

Les colònies formades han de ser més de 30 i menys de 300 per tal considerar-les com a comptables. A la figura següent es pot observar un dels resultats que es van tenir durant l'experiment:

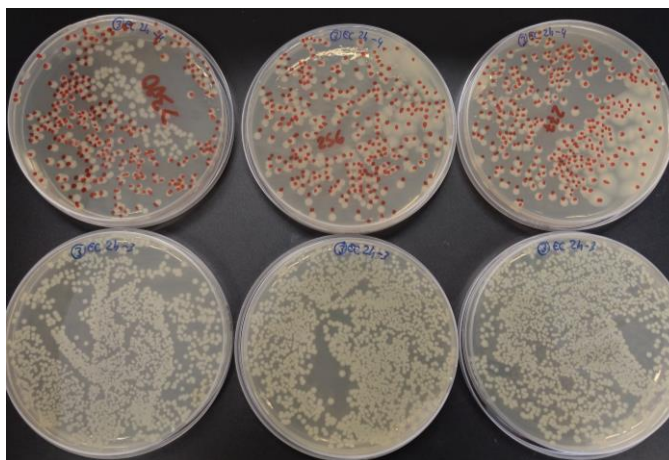


Figura 22: colònies formades després de 24 hores d'incubació a 37 °C

Un cop comptabilitzats tots els cultius s'han obtingut els resultats següents:

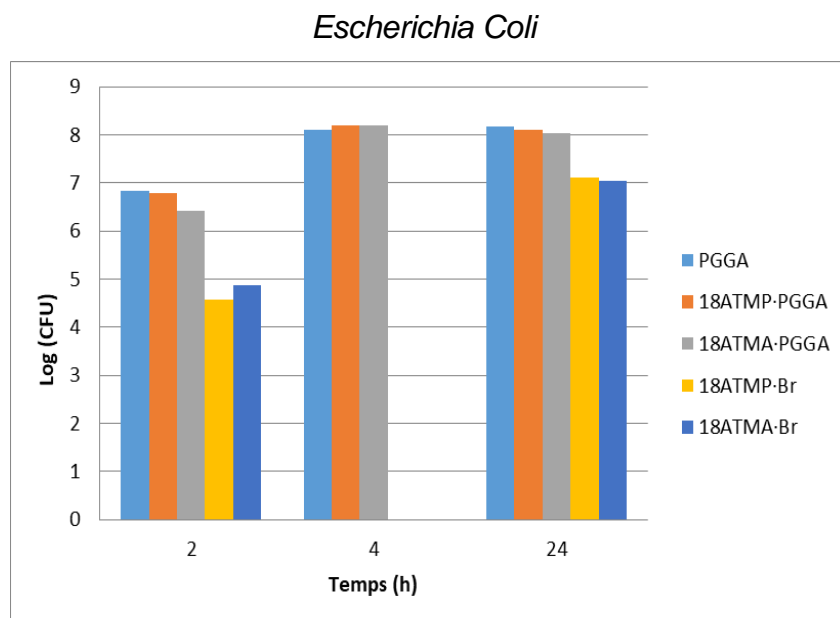


Figura 23: quantificació de l'activitat biocida en presència del bacteri *Escherichia Coli*

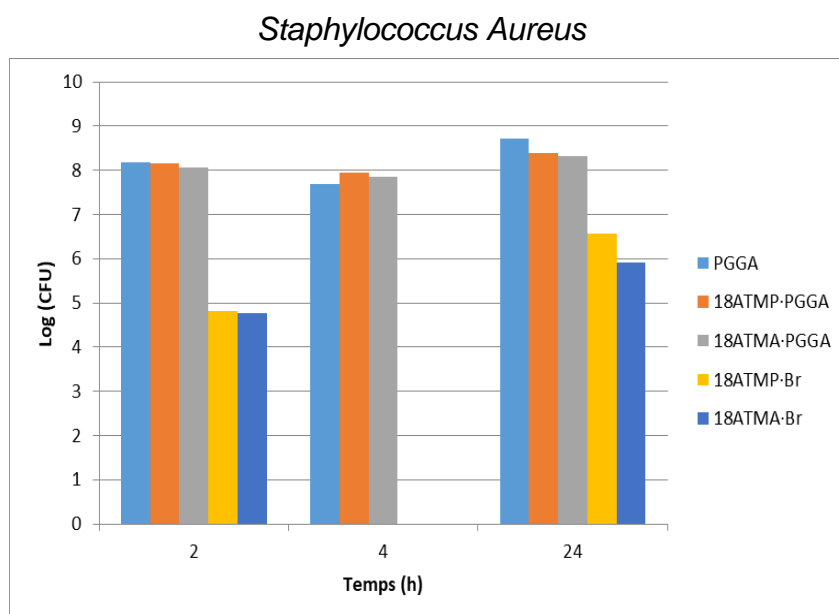


Figura 24: quantificació de l'activitat biocida en presència del bacteri *Staphylococcus Aureus*

Les *Figures 22 i 23*, mostren els resultats obtinguts sobre l'activitat biocida dels complexos.

La conclusió inicial que es pot extreure d'aquest estudi és que els complexos estudiats mostren activitat antimicrobiana contra els bacteris Gram-positius i Gram-negatius. Aquesta activitat és deguda a la part organofosfònica o organoamònica que es lliura principalment al medi aquós després de la incubació. A partir dels resultats obtinguts es pot concloure també que l'activitat bactericida dels complexos està determinada per la solubilitat en aigua del tensioactiu implicat en cada cas i per l'estabilitat del complex respecte a les condicions d'incubació.

5. AVALUACIÓ ECONÒMICA

Per tal d'estimar el cost total que ha tingut aquest projecte, s'ha realitzat un estudi on s'han inclòs costos referents als productes utilitzats, les anàlisis fetes i les hores invertides per tal de dur a terme el projecte.

5.1. Cost dels productes

S'han inclòs els costos relacionats amb els productes químics utilitzats, tant sòlids com líquids.

<i>Productes líquids</i>	<i>mL utilitzats</i>	<i>Preu (€/mL)</i>	<i>Cost (€)</i>
<i>Cloroform</i>	6	0,0658	3,948
<i>Aigua peptonada</i>	120	0,1038	12,456
<i>Aigua destil·lada</i>	10000	0,0007	7

TOTAL 23,40 €

<i>Productes sòlids</i>	<i>g utilitzats</i>	<i>Preu (€/g)</i>	<i>Cost (€)</i>
<i>18ATMA·Br</i>	1	1,54	1,54
<i>Na·PGGA</i>	0,790	50	39,5
<i>KH₂PO₄</i>	1,512	0,108	0,1633
<i>NaHCO₃</i>	0,420	0,0326	0,0137

Na_2HPO_4	0,130	0,172	0,302
$NaOH$	0,040	0,0295	0,0012
TSA	250	0,14	35
TSB	50	0,11	5,5

TOTAL 88,02 €

5.2. Cost de caracterització

S'han inclòs els costos relacionats amb la realització de les proves necessàries per caracteritzar els complexos al llarg del projecte.

Mètode de caracterització	Nº de proves	Preu (€/mostra)	Cost (€)
RMN	4	30	120
DSC	28	30	840
TGA	4	30	120
Espectroscòpia IR	8	20	160
Espectroscòpia UV	60	5	300

TOTAL 1540€

5.3. Cost personal

El cost personal s'ha calculat suposant un salari d'enginyer químic en pràctiques i comptabilitzant el total d'hores invertides en el projecte.

El total d'hores s'ha calculat sabent que un crèdit ECTS equival a 25 hores de treball i el projecte té un pes de 24 crèdits.

<i>Feina</i>	<i>Hores treballades</i>	<i>Preu (€/hora)</i>	<i>Cost (€)</i>
<i>Enginyer en pràctiques</i>	600	12	7200

TOTAL 7200 €

5.4. Cost de material de laboratori

S'han inclòs els diversos costos tenint en compte tant el material reutilitzable com el d'un sol ús.

<i>Material</i>	<i>Unitats</i>	<i>Vida útil</i>	<i>Preu (€/unitat)</i>	<i>Cost (€)</i>
<i>Vas de precipitats</i>	4	Reutilitzable	15,10	60,40
<i>Vials de vidre</i>	8	Reutilitzable	0,4	3,20
<i>Matràs d'Erlenmeyer</i>	2	Reutilitzable	4,86	9,72
<i>Pipeta</i>	2	Reutilitzable	2,96	5,92
<i>Pipeta Pasteur</i>	2	Un sol ús	0,18	0,36
<i>Proveta</i>	1	Reutilitzable	7,79	7,79
<i>Embut Buchner</i>	1	Reutilitzable	10,78	10,78
<i>Morter amb mà d'àgata</i>	1	Reutilitzable	56,90	56,90
<i>Càpsula de porcellana</i>	1	Reutilitzable	9,58	9,58
<i>Matràs Kitasato</i>	1	Reutilitzable	22,39	22,39
<i>Placa Petri plàstic</i>	360	Un sol ús	0,1	36
<i>Paper filtrar</i>	6	Un sol ús	0,0911	0,5466

<i>Tub diàlisi</i>	10	Un sol ús	10,22	102,20
<i>Punta pipeta</i>	100	Un sol ús	0,0077	0,77
<i>Tub Eppendorf</i>	120	Un sol ús	0,01	1,20
<i>Nansa de sembra</i>	36	Un sol ús	0,3146	11,3256
<i>Guants</i>	14	Un sol ús	0,3	4,20
<i>Iman</i>	2	Reutilitzable	1,73	3,46
<i>Tira pH</i>	4	Un sol ús	0,182	0,728
<i>Espàtula</i>	2	Reutilitzable	3,96	7,92
<i>Escombreta</i>	1	Reutilitzable	1,85	1,85
<i>Cubeta de quars</i>	1	Reutilitzable	75,10	75,10

TOTAL 432,34 €

5.5. Resum de costos

A continuació es presenta el resum dels costos totals del projecte.

<i>Cost dels productes</i>	111,42€
<i>Cost de caracterització</i>	1540 €
<i>Cost personal</i>	7200 €
<i>Cost de material de laboratori</i>	432,34 €

TOTAL 9283,76 €

6. AVALUACIÓ DE L'IMPACTE AMBIENTAL

Durant el transcurs del projecte s'han seguit tota una sèrie de mesures i precaucions per tal de minimitzar l'impacte ambiental.

Tenint en compte que la massa dels tensioactius ha estat poca, l'impacte provocat ha estat poc considerable. Per altra banda, el polímer utilitzat, l'àcid poli-(γ -glutamic), és d'origen natural, fet que disminueix l'impacte ambiental al mínim.

Els dissolvents residuals han estat reciclats mitjançant contenidors que classifiquen el residu segons la seva naturalesa, per tal de reduir l'impacte ocasionat.

Pel que fa als processos de síntesi del complexos, a les tècniques de caracterització utilitzades i a les degradacions tèrmiques, s'ha procurat reduir les emissions de volàtils i altres agents contaminants i s'han utilitzat campanes d'extracció de gasos sempre que ha estat possible.

Durant l'anàlisi de l'activitat antimicrobiana s'han seguit una sèrie de protocols específics degut a que s'ha treballat amb mostres biològiques que necessiten ser tractats amb especial atenció. Es tracta de residus sanitaris bioperil·losos, ja que contenen restes de cultius i reserves d'agents infecciosos. Aquest tipus de residus s'han d'abocar a un envàs de 30 L de color negre amb tapa groga com el de la figura següent.



Figura 25: recipient on s'aboquen residus sanitaris bioperil·losos

Tot seguit s'etiqueta l'envàs i s'emmagatzema en armaris de seguretat o en un magatzem de residus tòxics. Per últim aquests residus seran recollits periòdicament per gestors autoritzats.

7. CONCLUSIONS

- S'han sintetitzat els complexos 18ATMA·PGGA i 18ATMP·PGGA, i s'ha determinat l'estequiometria tensioactiu : PGGA, que ha estat 1,1:1 en els dos casos.
- El 18ATMP·PGGA és més estable a nivell tèrmic que el 18ATMA·PGGA. El complex de fosfoni comença a degradar-se a 307 °C, en canvi, el d'amoni, a 218 °C.
- La temperatura de fusió dels complexos al segon escalfament és 19°C (complex de fosfoni) i 25°C (complex d'amoni) inferior a la temperatura de fusió del primer escalfament, la qual és propera a 50°C. La diferència de les temperatures de fusió dels dos escalfaments es relaciona amb la rapidesa de la cristal·lització.
- Mitjançant cristal·lització isotèrmica dels dos complexos, s'han determinat les constants de l'equació d'Avrami, que indiquen un mecanisme de nucleació i creixement similar i molt ràpid en els dos casos. L'exponent de l'equació d'Avrami té un valor entre 2 i 3 per als dos complexos.
- S'han obtingut films dels complexos i se n'ha estudiat la dissociació en medi aquós. Els valors d'absorbància obtinguts de l'exposició dels films al medi bàsic indiquen que els films dels dos complexos van dissociant-se progressivament al llarg dels 5 dies que ha durat l'experiment. En medi àcid i en medi neutre, clarament es produeix dissociació durant el primer dia, però a temps més llargs calen més experiències per interpretar el que passa.
- Els complexos sintetitzats mostren una certa activitat bactericida com a conseqüència de l'alliberament del tensioactiu ionicament enllaçat a la cadena principal que es produeix en aquests complexos quan s'incuben en medis aquosos. La combinació d'aquesta propietat amb la capacitat de formar pel·lícules confereix a aquests complexos potencial per a ser utilitzats en aplicacions actives de revestiment o embalatge.

8. AGRAÏMENTS

En primer lloc vull agrair a la Dra. Lourdes Urpí i a la Dra. Montserrat García Àlvarez la oportunitat que m'han donat, realitzar aquest projecte al departament d'Enginyeria Química de l'ETSEIB ha estat un plaer.

També vull agrair al Dr. Antxon Martínez de Ilarduya Sáez de Asteasu la seva ajuda a l'hora de realitzar i analitzar tots els espectres RMN i a l'Ana Gamarra pel seu suport i els seus consells sobretot en els primers passos del projecte.

Vull donar les gràcies també a l'Eva Forés, que m'ha ajudat a endinsar-me una mica al món de la microbiologia i m'ha guiat a l'hora d'analitzar l'activitat biocida dels complexos.

També m'agradaria donar les gràcies a tots els membres del grup POL (Polímers Industrials Avançats i Biopolímers Tecnològics) per la seva disposició a l'hora de atendre les meves consultes i ajudar-me quan ha estat necessari.

M'agradaria donar les gràcies a la Irene, companya de viatge, que m'ha motivat, ajudat i comprés durant aquests anys, i a l'Aniol i l'Àlex que sempre han estat allà per treure'm un somriure quan arribava a casa.

Finalment vull agrair als meus pares i a la meva germana el seu suport incondicional. Els ideals que m'han inculcat són un tresor, m'ajudaran i acompanyaran sempre. La seva ajuda, motivació i paciència ha estat el motor que m'ha impulsat durant tot aquest viatge

9. BIBLIOGRAFIA

- [1] Farn, R. J. *Chemestry and Technology of Surfactants*, Blackwell Publishing Ltd, 2006.
- [2] Gamarra A., Urpí L., Martínez de Ilarduya A., Muñoz-Guerra, S. *Crystalline structure and thermotropic behavior of alkyltrimethylphosphonium amphiphiles*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2017, 19, 437.
- [3] Portilla-Arias, J.A., Muñoz-Guerra, S., Barradas-Dermitz, D. M., Aguilar-Uscanga, M. G., *Ácido poli (γ -glutámico): Producción y Aplicaciones Biomédicas*, 2012, Vol. 16, No. 3.
- [4] Rehm, Bern H. A., *Microbial production of biopolymers and polymer precursors*, 2009, Institute of Molecular BioSciences, New Zeland.
- [5] Tolentino A. Tesis doctoral en Polímeros y Biopolímeros (UPC, 2014).
- [6] Kóvacs, J., Schmit, G.N., Johnson, B.J. A new synthesis of poly(γ -D and L-glutamic acid, *Can. J. Chem* 1969, 27, 3690-3693.
- [7] Kóvacs, J.; Nagy, H., Ballina, R. *Glutamic and aspartic anhydrides. Rearrangement of N-carboxyglutamic 1,5-anhydride to the Leuchs' anhydride and conversión of the latter to pyroglutamic acid*, J.Am. Chem. Soc. 1963, 85, 839.
- [8] Kakigi, N., Hamano, T., Akashi, M, Morita, N., Takeda, H. *Poly- γ -glutamate as pharmaceutical carrier in manufacturing sustained-release anticancer agents*, Jpn. Kokai Tokyo Koho, 1994.
- [9] Aguilera, J. M., Lillford, P. J., *Food Materials Science, Principles and Practice*, Springer, 2008.
- [10] Virgilio A., González G., Carlos A., Guerrero S., Juan A., Aguilar, G. *Nucleación y crecimiento unidimensional, Parte I: El modelo y su validación*, Ingenierías, Abril-Junio 2002, Vol. V, No. 15.
- [11] Fernández, L., *Estudio comparativo de complejos del ácido poli (γ -glutámico) con tensioactivos de amonio y de fosfonio*, (UPC 2017).
- [12] Gamarra. A., Martínez de Ilarduya, A., Vives, M., Morató, J., Muñoz-Guerra, S. *Polymer* 116. (2017) 43-54.
- [13] Muñoz-Guerra, S., García-Alvarez, M., Portilla-Arias, J.A., Renew, J. *Mater* 1 (1)

(2013) 42-60.

- [14] Pérez-Camero, G., García-Álvarez, M., Martínez de Ilarduya, A., Fernández, C., Campos, L., Muñoz-Guerra, S. *Biomacromolecules* (1), 2004 144-152.
- [15] Antonietti, M., Conrad, J., Thuenemann, A. *Macromolecules* 27 (21), 1994, 6007-6011.
- [16] García-Álvarez, M., Álvarez, J., Alla, A., Martínez de Ilarduya, A., Herranz, C., Muñoz-Guerra, S. *Macromol. Biosci.* 5 (1), 2005, 30-38.
- [17] Tolentino, A., Alla, A., Muñoz-Guerra, S. *Eur. Polym. J.* 48 (11), 2012, 1838-1845.
- [18] Tolentino, A., León, S., Alla, A., Martínez de Ilarduya, A., Muñoz-Guerra, S. *Macromolecules* 46 (4), 2013, 1607-1617.
- [19] Tolentino, A., Alla, A., Martínez de Ilarduya, A., Muñoz-Guerra, S. *Int. J. Biol. Macromol.* 66, 2014, 346-353.
- [20] García-Álvarez M., Álvarez J., Alla A., Martínez de Ilarduya A., Herranz C., Muñoz-Guerra S. *Comb-like ionic complexes of cationic surfactants with bacterial poly(gamma-glutamic acid) of Racemic composition.* *Macromol. Biosci.* 2005, 5, 30–38.
- [21] Portilla-Arias, J. A., García-Alvarez, M., Martínez de Ilarduya, A., Muñoz-Guerra, S. *Thermal decomposition of microbial poly(γ -glutamic acid) and poly(γ -glutamate)s.* 2007, 92, 1916-1924.
- [22] *Lecture 15: Kinetics of Phase Growth. Single-component or composition-invariant transformation.*

Es pot consultar al web: <https://pubweb.eng.utah.edu/~lzung/images/lecture-15.pdf>
- [23] *Procediment sobre recollida de residus*, UNESCO Chair on Sustainability (UPC, ESEIAAT).

